



Entwicklung und Charakterisierung von neuartigen glattmuskulären Zellsystemen für die Wirkstoffforschung

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades

einer Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Aileen Bleisch
aus Lauchhammer

| | |
|-------------------------------------|-----------------------------------|
| 1. Referent: | Professor Dr. Klemens Rottner |
| 2. Referent: | apl. Professor Dr. Stephan Reichl |
| eingereicht am: | 09.12.2019 |
| mündliche Prüfung (Disputation) am: | 30.01.2020 |

Druckjahr 2020

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Bleisch, A; May, T; Dehmel, S; Wadsworth S: Cell on cell – functionally immortalized smooth muscle cells as building blocks for 3D tissues. (Poster). 3D Cell Culture Conference, Freiburg, Deutschland (2018)

Bleisch, A; May, T: Cell on cell – functionally immortalized smooth muscle cells as building blocks for 3D tissues. (Poster). ESACT Frontiers Retreat, Zagreb, Kroatien (2018)

Bleisch, A; Dehmel, S; May, T: Functional smooth muscle cell lines as in vitro test systems for the drug development. (Poster). European Muscle Conference, Canterbury, England (2019)

Zusammenfassung

Zellen der glatten Muskulatur sind überall im menschlichen Körper vorzufinden und übernehmen eine Vielzahl von Funktionen. Ihre Hauptfunktion ist die starke und effiziente Kontraktion. Damit regulieren sie unter anderem die Peristaltik im Magen-Darm-Trakt, die Wehen während des Geburtsvorgangs sowie den Druck in den Gefäßen und Bronchien. Daher spielen Glattmuskelzellen eine entscheidende Rolle bei pathologischen Erkrankungen wie Asthma, der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) oder dem Bluthochdruck und besitzen einen hohen Stellenwert als Testsysteme für die präklinische Forschung. Für die Entwicklung neuer Wirkstoffe werden Zellsysteme benötigt, die möglichst genau die in-vivo Situation außerhalb des Organismus widerspiegeln. Dafür wurden im Zuge dieser Arbeit mittels der CI-SCREEN Immortalisierung neuartige, glattmuskuläre Testsysteme generiert. Neben Glattmuskelzelllinien des Bronchus, der Pulmonalarterie und der Aorta gesunder Spender wurden Atemwegsglattmuskelzelllinien eines COPD Spenders etabliert, um deren Mehrwert für die Wirkstoffentwicklung zu evaluieren. Für die Entwicklung glattmuskelspezifischer Immortalisierungsprotokolle wurde die Genintegration und -expression der immortalisierenden Gene analysiert. Dabei wurde deutlich, dass für die Immortalisierung primärer Glattmuskelzellen die Gene Bmi1, E7, MYC, Nanog und E6 eine wichtige Rolle spielen. Die Aufrechterhaltung des Glattmuskelphänotyps wurde mit Hilfe von Genexpressionsanalysen und immunzytochemischen Färbungen untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass spezifische Markergene wie *α-smooth muscle actin* (ACTA2), Sm22-α oder Calponin in den generierten Linien sowie in den primären Zellen kaum exprimiert wurden. Um die Expression dieser Gene zu steigern, wurden verschiedene Kultivierungsbedingungen getestet. Dazu zählten die 3D-Kultivierung und die Veränderung der Medienzusammensetzung. Es stellte sich heraus, dass die Zusätze TGF-β1 und B27 die Expression der glattmuskulären Gene deutlich steigerten. Die Fluoreszenzanalyse ergab, dass die Zellen nahezu aller Linien zu 100 % positiv für Calponin waren. Der Anteil an ACTA2-positiven Zellen konnte ebenfalls deutlich gesteigert werden. Außerdem wurde die Kontraktion der Zelllinien untersucht. Dabei wurde zunächst auf molekularer Ebene die Ausschüttung von Calciumionen nach Histamin-, Serotonin- oder Methacholinstimulation und somit die Expression der entsprechenden GPCRs festgestellt. Der Nachweis der Kontraktion der Zelllinien erfolgte anhand der Besiedelung dezellularisierter Lungenpräzisionsschnitte (PCLS). Die Anwendung der Zelllinien und deren Potential für die Wirkstoffentwicklung wurde abschließend anhand eines klinisch relevanten Medikaments, das Antihistaminikum Levocetirizin, getestet. Die Ergebnisse zeigen, dass sich gesunde und erkrankte Glattmuskellinien deutlich unterscheiden. Entsprechend reichten für die Inhibition des Histaminrezeptors gesunder Zellen 10-fach geringere Mengen an Levocetirizin aus verglichen mit den Zellen des COPD Spenders. Die Daten dieser Arbeit zeigen somit das Potential der entwickelten Glattmuskelzelllinien erkrankter und gesunder Spender als in-vitro Testsysteme für die Wirkstoffentwicklung.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Zusammenfassung | |
| Inhaltsverzeichnis | IV |
| Abbildungsverzeichnis | VI |
| Tabellenverzeichnis | IX |
| Abkürzungsverzeichnis | X |
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Die Muskulatur - Aufbau und Funktion | 1 |
| 1.2. Die glatte Muskulatur | 2 |
| 1.2.1 Der Glattmuskelphänotyp | 4 |
| 1.2.2 Kontraktion | 5 |
| 1.3 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren..... | 7 |
| 1.3.3 Histaminrezeptoren | 8 |
| 1.3.4 Muskarinrezeptoren..... | 8 |
| 1.3.5 5-Hydroxytryptamin-Rezeptoren | 8 |
| 1.4 Erkrankungen der Glattmuskulatur..... | 9 |
| 1.4.1 Erkrankungen der Atemwegsglattmuskulatur..... | 9 |
| 1.4.2 Erkrankungen der vaskulären Muskulatur..... | 11 |
| 1.5 Modelle zur in-vitro Testung von Medikamenten | 12 |
| 1.6 Die Zellkultur | 14 |
| 1.6.1 Primäre Zellen | 14 |
| 1.6.2 Zelllinien | 15 |
| 1.6.3 CI-SCREEN Immortalisierung..... | 16 |
| 1.7 Zielstellung der Arbeit | 18 |
| 2. Material und Methoden | 19 |
| 2.1 Material..... | 19 |
| 2.1.1 Biologische Materialien..... | 19 |
| 2.1.2 Chemikalien, Puffer und Reagenzien..... | 19 |
| 2.1.4 Kits | 21 |
| 2.1.5 Antikörper | 21 |
| 2.1.6 Primerpaare..... | 22 |
| 2.1.8 Geräte | 24 |

| | |
|--|-----|
| 2.2 Methoden..... | 24 |
| 2.2.1 Zellkultur..... | 24 |
| 2.2.2 Lentiviren und Infektion | 26 |
| 2.2.3 Molekularbiologische Methoden | 28 |
| 2.2.4 Funktionale Tests | 33 |
| 3. Ergebnisse | 39 |
| 3.1 Analyse und Kultivierung primärer Glattmuskelzellen..... | 39 |
| 3.2 Generierung funktionaler Glattmuskelzelllinien | 41 |
| 3.3 Charakterisierung der Glattmuskelzelllinien | 52 |
| 3.3.1 Analyse zelltypspezifischer Marker auf RNA und Protein Ebene..... | 53 |
| 3.3.2 Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf die Markerexpression | 57 |
| 3.3.3 Analyse der Funktionalität mit Hilfe des Calciumindikators Fluo-4..... | 68 |
| 3.3.4 Nachweis der Kontraktion | 80 |
| 3.3.5 Sprouting von immortalen PASMC in Kokultur mit Endothelzellen | 93 |
| 3.4 Anwendung der generierten Glattmuskelzelllinien..... | 96 |
| 4. Diskussion..... | 101 |
| 4.1 Immortalisierungsansätze für die Generierung von Glattmuskelzelllinien | 101 |
| 4.1.1 Funktionen und Einflüsse der verschiedenen Immortalisierungsgene auf die Immortalisierung von Glattmuskelzellen | 103 |
| 4.1.2 Reduktion der Immortalisierungsgene | 106 |
| 4.2 Analyse des Glattmuskelphänotyps | 107 |
| 4.2.1 Morphologie und spezifische Markerexpression | 107 |
| 4.2.2 GPCR-Rezeptorexpression und Kontraktion..... | 108 |
| 4.3 Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf den Glattmuskelphänotyp..... | 115 |
| 4.4 Zusammenhang zwischen Immortalisierung und Glattmuskelphänotyp | 120 |
| Ausblick..... | 121 |
| Danksagung | 123 |
| Referenzen..... | 125 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Struktur einer Glattmuskelzelle. | 4 |
| Abbildung 2: Ablauf der Kontraktion in Glattmuskelzellen. | 7 |
| Abbildung 3: Morphologie primärer Glattmuskelzellen. | 39 |
| Abbildung 4: Testung zweier Kultivierungsmedien. | 41 |
| Abbildung 5: Transduktionseffizienz primärer Glattmuskelzellen. | 42 |
| Abbildung 6: Immortalisierte PASMC und BSMC. | 43 |
| Abbildung 7: Stabilität der Morphologie. | 44 |
| Abbildung 8: Zellmorphologien weiterer Zelllinien im Vergleich zu den primären Ausgangszellen. | 45 |
| Abbildung 9: Kumulative Populationsverdopplungen verschiedener generierter Glattmuskellinien. | 46 |
| Abbildung 10: Analyse der integrierten Immortalisierungsgene. | 47 |
| Abbildung 11: Relative Genexpression der integrierten Immortalisierungsgene. | 49 |
| Abbildung 12: Genexpression über der Zeit. | 51 |
| Abbildung 13: mRNA Expression von Glattmuskelzellmarkern. | 54 |
| Abbildung 14: Immunzytochemie des Glattmuskelmarkers ACTA2. | 56 |
| Abbildung 15: Immunzytochemie des Glattmuskelmarkers Calponin. | 57 |
| Abbildung 16: Serumfreie Kultivierung einer Glattmuskelzelllinie zur Steigerung des Glattmuskelphänotyps. | 58 |
| Abbildung 17: 3D-Kultivierung einer Glattmuskellinie zur Steigerung des Glattmuskelphänotyps. | 59 |
| Abbildung 18: Expressionssteigerung von ACTA2 und Calponin im Stimulierungsmedium. | 60 |
| Abbildung 19: Stimulierung einer BSMC Linie über der Zeit. | 60 |
| Abbildung 20: Einfluss der Kultivierungsmedien auf die Zellproliferation. | 62 |
| Abbildung 21: Stimulierung einer Glattmuskelzelllinie in 3D. | 62 |
| Abbildung 22: ACTA2-Färbung stimulierter Glattmuskellinien. | 64 |
| Abbildung 23: Calponin-Färbung stimulierter Glattmuskelzelllinien. | 65 |
| Abbildung 24: Stimulation der Kontrollzellen mit TGF- β 1 und B27. | 66 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 25: Relative ACTA2 mRNA Expression vor und nach Stimulation..... | 67 |
| Abbildung 26: Erhöhung der Genexpression glattemuskelspezifischer Marker in Glattemuskulenzellen. | 68 |
| Abbildung 27: Überprüfung der Funktionalität des Fluo-4 Calciumtests..... | 70 |
| Abbildung 28: Nachweis von Histaminrezeptoren auf der Oberfläche der Glattemuskellinien mittels des Fluo-4 Tests..... | 71 |
| Abbildung 29: Graphische Darstellung der Fluoreszenzsignale mittels ImageJ. | 73 |
| Abbildung 30: Anstieg der Fluoreszenzintensität in verschiedenen Linien nach Stimulation mit 1 μ M Histamin. | 74 |
| Abbildung 31: Dosisabhängige Reaktionskurven von Histamin in verschiedenen Glattemuskellinien. | 75 |
| Abbildung 32: Stimulation primärer BSMC mit verschiedenen Histaminkonzentrationen. | 76 |
| Abbildung 33: Dosisabhängige Reaktionskurven von Methacholin in Atemwegsmuskulenzellen. | 78 |
| Abbildung 34: Konzentrationsabhängige Reaktionskurven von Serotonin in PASMC und Fibroblasten..... | 79 |
| Abbildung 35: Messung des Ca^{2+} - Influx nach Vorstimulation mit TGF- β 1 und B27 in PASMC. | 80 |
| Abbildung 36: Analyse der Kontraktion der BSMC im Kollagenegel..... | 82 |
| Abbildung 37: Generierung von Lungen-Präzisionsschnitten aus dem Schwein. | 83 |
| Abbildung 38: Besiedlung der dezellularisierten Lungen-Präzisionsschnitte. | 85 |
| Abbildung 39: Wiederbesiedelte dezellularisierte Gerüste einen Tag nach der Besiedlung. . | 86 |
| Abbildung 40: Wiederbesiedelte dezellularisierte Gerüste sieben Tage nach der Besiedlung. | 87 |
| Abbildung 41: Messung der Kontraktion von rezellularisierten Atemwegsschnitten nach Histaminstimulation..... | 88 |
| Abbildung 42: Kontraktionsmessung rezellularisierter Atemwegsschnitte nach Histaminstimulation..... | 89 |
| Abbildung 43: Stimulation besiedelter Kontroll-Gerüste mit 1 μ M Histamin..... | 90 |
| Abbildung 44: Stimulation besiedelter Gerüste mit 1 μ M Histamin..... | 91 |
| Abbildung 45: Dosis-Wirkungskurven für Serotonin und Methacholin. | 92 |
| Abbildung 46: Stimulierung der BSMC auf dem Lungengerüst. | 92 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 47: Mediumtest für Kokultivierung von PASMC und EC. | 93 |
| Abbildung 48: Mediumtest der Endothelzellen zur Feststellung des Kokulturmediums. | 94 |
| Abbildung 49: Sprouting-Test von immortalen PASMC und EC. | 96 |
| Abbildung 50: Hemmung des Histaminrezeptors durch Levocetirizin führt zur Inhibition des Calciumflux. | 98 |
| Abbildung 51: Partielle Inhibition des Calciumflux durch Levocetirizin in COPD Zellen. | 99 |
| Abbildung 52: Inhibition der Kontraktion rezellularisierter Gerüste durch das Antihistaminikum Levocetirizin. | 100 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Biologische Materialien | 19 |
| Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien | 19 |
| Tabelle 3: Puffer/Lösungen | 20 |
| Tabelle 4: Grundmedien | 20 |
| Tabelle 5: Medienzusätze..... | 20 |
| Tabelle 6: Medienzusammensetzung | 21 |
| Tabelle 7: Kits | 21 |
| Tabelle 8: Antikörper | 21 |
| Tabelle 9: PCR Primerpaare zum Nachweis der Genintegration der Immortalisierungsgene | 22 |
| Tabelle 10: qPCR- Primerpaare zur Ermittlung der Genexpression immortalisierender Gene | 22 |
| Tabelle 11: qPCR- Primerpaare zum Expressionsnachweis spezifischer Glattnuskelgene | 23 |
| Tabelle 12: Verbrauchsmaterialien | 23 |
| Tabelle 13: Geräte..... | 24 |
| Tabelle 14: Zusammensetzung des PCR-Mixes zur Amplifikation spezifischer DNA Fragmente zum Nachweis integrierter Immortalisierungsgene | 28 |
| Tabelle 15: PCR-Programm zur Amplifizierung der DNA-Fragmente..... | 29 |
| Tabelle 16: Zusammensetzung des cDNA-Synthese Mixes..... | 30 |
| Tabelle 17: Zusammensetzung des qPCR-Ansatzes..... | 31 |
| Tabelle 18: qPCR-Programm zur Amplifikation spezifischer RNA Fragmente | 31 |
| Tabelle 19: Zusammensetzung der Glattnuskelmedien | 40 |
| Tabelle 20: Integration der einzelnen immortalisierenden Gene in den Glattnuskelzellen in Prozent. | 48 |
| Tabelle 21: Immortalisierungsansatz mit reduzierter Genauswahl. | 52 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------------|---|
| 2D | zweidimensional |
| 3D | dreidimensional |
| 5-HT | 5-Hydroxytryptamin |
| ACTA2, α -SMA | alpha-Glattmuskelaktin (<i>engl. alpha smooth muscle actin</i>) |
| β 2M | β 2-Mikroglobulin |
| Bmi1 | Polycomb complex protein BMI-1 |
| bp | Basenpaare |
| Ca^{2+} | Calcium-Ionen |
| CCVK-1 | kolorimetrisches Zellviabilitätskit-1 |
| CLSM | konfokales Laser-Scanning-Mikroskop |
| COPD | chronisch obstruktive Lungenerkrankung (<i>engl. chronic obstructive pulmonary disease</i>) |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| DAG | Diacylglycerol |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ECM | extrazelluläre Matrix |
| FBS | fetales Kälberserum |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| GPCR | G-Protein-gekoppelter Rezeptor |
| EGF | epidermaler Wachstumsfaktor |
| FGF2 | Fibroblasten-Wachstumsfaktor Beta |
| hTERT | humane Telomerase (<i>engl. human telomerase reverse transcriptase</i>) |
| ID1 | DNA-binding protein inhibitor ID-1 |
| ID2 | DNA-binding protein inhibitor ID-2 |
| ID3 | DNA-binding protein inhibitor ID-3 |
| IP_3 | Inositoltrisphosphat |
| min | Minute |
| MLC | leichte Kette des Myosins |
| MLCK | Myosinleichtkettenkinase |
| MLCP | Myosinleichtkettenphosphatase |
| MOI | Multiplizität der Infektionen |
| Myh11 | Myosin schwere Kette 11 |
| Nanog | Homöoboxprotein NANOG |
| pAoSMC | primäre Glattmuskelzellen der Aorta |
| pASMC (COPD) | primäre Atemwegsglattmuskelzellen eines COPD Spenders |
| pBSMC | primäre Glattmuskelzellen des Bronchus |
| PCR | Polymerase Kettenreaktion |
| PCLS | Präzisionsschnitte der Lunge (<i>engl. precision-cut lung slices</i>) |
| PDL | Populationsverdopplung |
| PKC | Proteinkinase C |
| pPASMC | primäre Glattmuskelzellen der Pulmonalarterie |
| pRB | Retinoblastom-Protein |

| | |
|----------------|---|
| RT | Raumtemperatur |
| RPM | Rotationen pro Minute |
| RyR | Ryanodin-Rezeptor |
| TAg | großes T-Antigen (<i>engl. SV40 large T antigen</i>) |
| TGF- β 1 | transformierender Wachstumsfaktor β 1 |
| TLR | Toll-ähnlicher Rezeptor |
| s | Sekunde |
| SR | sarkoplasmatisches Retikulum |
| VDCC | spannungsabhängige Calciumkanäle |
| WST-8 | wasserlösliches Tetrazoliumsalz 8 |

1. Einleitung

1.1 Die Muskulatur - Aufbau und Funktion

Kontraktion ist die Hauptfunktion des Organsystems Muskulatur (Cooper 2000; Lippert, Herbold, und Lippert-Burmester 2006; Pollard und Earnshaw 2007; Alberts et al. 2015). Durch Kontraktion und Relaxation ist sie in der Lage verschiedene äußere sowie innere Körperstrukturen anzusteuern. Diese ATP-gesteuerten Prozesse resultieren aus Wechselwirkungen von Aktin – und Myosinfilamenten (Cooper 2000; Alberts et al. 2015). Die Muskulatur ermöglicht uns somit unter anderem die aktive Fortbewegung aber auch die Nahrungsweiterleitung im Magen-Darm-Trakt oder das Pumpen des Bluts durch die Gefäße des Körpers. Aufgrund von Unterschieden in der Struktur, der Entwicklung und in der Funktion lässt sich die menschliche Muskulatur in mehrere Klassen unterteilen. Dazu zählen die Glattmuskelzellen sowie die Herzmuskel- und Skelettmuskelzellen. Auch myoepitheliale Zellen werden aufgrund ihrer Kontraktion als Klasse der Muskelzellen gezählt (Alberts et al., 2015). Bei Myoepithelzellen handelt es sich um Epithelzellen, die Glattmuskeleigenschaften zeigen (Deugnier, Teulière, Faraldo, Thiery, & Glukhova, 2002). Sie sind in den Haut-, Milch- oder Schweißdrüsen sowie auch in Drüsen der Speiseröhre und der Atemwege vorzufinden. Durch die Fähigkeit zur Kontraktion unterstützen sie die Sekretabgabe aus den Drüsenendgängen.

Skelettmuskelzellen und Herzmuskelzellen gehören zur quergestreiften Muskulatur (Pollard und Earnshaw 2007; Alberts et al. 2015; Sweeney und Hammers 2018). Die quergestreifte Muskulatur lässt sich anhand der regelmäßigen Anordnung der kontraktile Filamente, den Sarkomeren, erkennen. Diese sind zu zylinderförmigen Bündeln, den Myofibrillen aneinandergereiht. In der quergestreiften Muskulatur machen Aktin- und Myosinfilamente 40 % der Zelle aus (Sengbusch, 1979). Skelettmuskelzellen sind hauptsächlich für die willkürliche Bewegung des Skeletts zuständig (Alberts 2015; Mukund und Subramaniam 2019). Sie sind aber auch in der Muskulatur der Zunge, des Kehlkopf und des Zwerchfells vorzufinden. Zellen dieses Typs können bis zu 2-3 cm lang sein und enthalten mehrere Zellkerne im Zytoplasma (Alberts et al., 2015). Das Nervensystem steuert den Zeitpunkt, die Kraft und die Schnelligkeit der Kontraktion. Skelettmuskelzellen sind darauf optimiert zügig und kraftvoll zu kontrahieren, jedoch ermüden die Zellen schnell.

Das Herz ist ein hochorganisierter muskulärer Schlauch, der für die Aufrechterhaltung der Blutzirkulation zuständig ist (Lippert, Herbold, und Lippert-Burmester 2006; Pollard und

Earnshaw 2007; Alberts et al. 2015). Die Blutzirkulation ist von der Kontraktion der Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) abhängig, dem daher wichtigsten Zelltyp des Herzens. Neben Kardiomyozyten spielen Endothelzellen, Perizyten, vaskuläre Glattmuskel- sowie Bindegewebszellen bei der Zusammensetzung des Herzens eine bedeutende Rolle (Weinberger, Mannhardt und Eschenhagen 2017; Perbellini et al. 2018). Kardiomyozyten lassen sich in die kraft-produzierenden atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten unterteilen sowie in die Schrittmacherzellen (Später, Hansson, Zangi, & Chien, 2014). Generell weicht die Struktur der Herzmuskelzellen leicht von der der Skelettmuskelzellen ab. Die Mehrheit der Zellen enthalten nur einen zentriert angeordneten Zellkern und die Zellen sind über Glanzstreifen miteinander verbunden. Diese enthalten Gap Junctions zur Signalübertragung und Desmosomen und Adhärenz-Kontakte zur Stabilisierung und Kraftübertragung zwischen den Zellen (Rohr, 2004). Schrittmacherzellen, die spontan Aktionspotentiale auslösen können, übernehmen die Grundsteuerung der Herzaktion. Über Gap Junctions werden die Aktionspotentiale von einer Muskelzelle zur nächsten verteilt. Durch eine erhöhte Mitochondriendichte sind die Schrittmacherzellen in der Lage schnell ATP zu generieren und damit resistenter gegen Ermüdung (Alberts et al., 2015).

1.2. Die glatte Muskulatur

Neben Myoepithel-, Skelettmuskel- und Herzmuskelzellen bilden die Glattmuskelzellen die vierte Klasse der Muskelzellen (Alberts et al., 2015). Glattmuskelzellen besitzen keine Sarkomere, wodurch ihnen die Querstreifung fehlt, die bei Herz- oder Skelettmuskelzellen lichtmikroskopisch zu erkennen ist (Pollard und Earnshaw 2007). Daher werden sie als „glatt“ beschrieben. In Glattmuskelzellen sind die Aktin- und Myosinfilamente in Bahnen entlang der Zelle angeordnet. Die Aktinfilamente reichen dabei von einer Seite der Zelle zur anderen und sind über sogenannte „dense bodies“ (intrazelluläre Verdichtungszone) miteinander verbunden (Abbildung 1). Diese bilden das Analog zu den Z-Streifen der quergestreiften Muskulatur und dienen als Anheftungsstellen der Aktinfilamente. In glatten Muskelzellen ist das *alpha smooth muscle actin* (ACTA2) die dominante Isoform der Aktine (Perrin und Ervasti 2010). Außerdem charakteristisch für glatte Muskelzellen sind die Typ III Intermediärfilamente Vimentin und Desmin, die zur mechanischen und strukturellen Integrität sowie Funktionalität der Zelle beitragen (Paulin und Li 2004; Tang 2008)

Glattmuskelzellen sind im Körper überall präsent (Pollard und Earnshaw 2007; Alberts et al. 2015; Sweeney und Hammers 2018). Sie kleiden die Wände von Hohlorganen, wie beispielsweise der Blase, des Magens, des Darms und des Uterus, aus. Auch sind sie

Bestandteil der Arterien, Venen und Atemwege. Glattmuskelzellen sind ebenfalls in der Haut und in der Iris vorzufinden. Je nach Lokalisation erfüllen Glattmuskelzellen verschiedene Funktionen, die in der Vielfältigkeit kaum zu überbieten sind (Hafen und Burns 2018; Sweeney und Hammers 2018). Sie reichen von der Druckregulierung in den Gefäßen, über die Peristaltik im Magen-Darm-Trakt, bis hin zu den Wehen während des Geburtsvorgangs und der Erweiterung der Pupillengröße. Detaillierter betrachtet regulieren Glattmuskelzellen der Atemwege (ASM) beispielsweise den bronchomotorischen Tonus sowie durch die Sekretion von Zytokinen (IL-1, IL-5, IL-6) und Chemokinen (IL-8, Rantes, Eotaxin) auch Entzündungen der Atemwege (Amrani and Panettieri 2003; Månsson Kvarnhammar et al. 2013; Faksh et al. 2016). In den oberen Atemwegen entspricht die Masse an Glattmuskelzellen etwa 25 %, während diese in den unteren Atemwegsbereichen ungefähr 4-5 % beträgt (Amrani und Panettieri 2003). Vaskuläre Glattmuskelzellen sind in allen Gefäßen des Körpers vorzufinden. Sie sind der Hauptzelltyp der mittleren Gefäßschicht, der *Tunica media*. Hier sind sie in eine Elastin- und Kollagen-reiche extrazelluläre Matrix eingebettet, die die Kontraktion und Relaxation der Zellen unterstützt. Glattmuskelzellen der Gefäße kontrollieren die Lumenweite und damit den Druck und Blutfluss in den Gefäßen. Nach Ausbildung der Gefäße, sind Glattmuskelzellen stark differenziert und kaum noch proliferativ (Roostalu und Wong 2018).

Morphologisch betrachtet sind Glattmuskelzellen spindelförmig und stets einkernig. Sie weisen Längen von 50-200 µm auf (Sweeney und Hammers 2018). Glattmuskelzellen zeichnen sich durch einen extrem hohen Verkürzungsgrad und eine geringe Ermüdbarkeit aus. Die Entwicklung der Glattmuskelzellen erfolgt von verschiedenen embryonalen Geweben. Dazu zählen die Neuralleiste, das paraxiale und somatische Mesoderm sowie das laterale Plattenmesoderm (Mikawa und Gourdie 1996; Amrani und Panettieri 2003; Wasteson et al. 2008; Roostalu und Wong 2018; Lam, Lamanna und Bourke 2019).

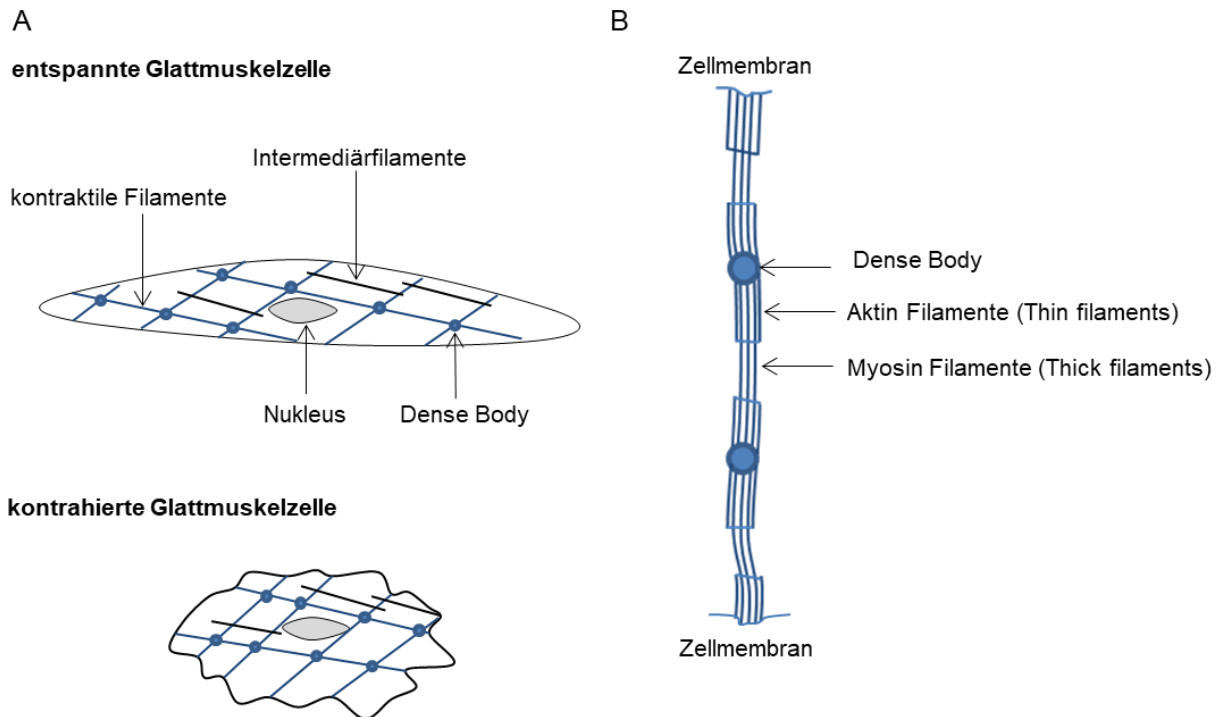


Abbildung 1: Struktur einer Glattmuskelzelle. A) Schematische Abbildung einer Glattmuskelzelle im entspannten und kontrahierten Zustand. B) Organisation der kontraktilen Elemente in der Zelle. Aktinfilamente sind über „Dense Bodies“ miteinander verbunden. (modifiziert nach Sweeney und Hammers 2018 und Alberts et al. 2015).

1.2.1 Der Glattmuskelphänotyp

Der Phänotyp der glatten Muskelzellen kann in „synthetisch“ und „kontraktil“ unterschieden werden (Rensen, Doevendans und Van Eys 2007; Beamish et al. 2010; Scirocco et al. 2016; Frismantiene et al. 2018). Der kontraktile Phänotyp ist nicht proliferativ und zeichnet sich durch eine hohe Produktion kontraktiler Proteine aus. Dazu zählen beispielsweise das *alpha smooth muscle actin* (ACTA2), Calponin, h-Caldesmon, Sm22-alpha (Transgelin) und die *Smooth muscle myosin heavy chain* (Myh11) (Beamish et al. 2010; Allahverdian et al. 2018). Die Morphologie der Zellen wird als ausgestreckt und spindelförmig beschrieben. Kommt es zu pathologischen Veränderungen, wie Atherosklerose oder Restenose, so kann sich der kontraktile zum synthetischen Phänotyp ändern (Beamish et al. 2010; Scirocco et al. 2016). Dieser Prozess kann auch als Dedifferenzierung bezeichnet werden. Synthetische Zellen zeigen ein gesteigertes Proliferations- und Migrationspotential und produzieren vermehrt Proteine der extrazellulären Matrix. Die Expression kontraktiler Proteine wird herunterreguliert (Frismantiene et al., 2018). Proteine, die die Erkennung des synthetischen Phänotyps unterstützen sind: Vimentin, Tropomyosin 4 und die *Nonmuscle Myosin heavy*

chain B (MYH10) (Beamish et al., 2010). Die Morphologie synthetischer Zellen ist im Vergleich zu der der kontraktile Zellen verkürzt und pflastersteinartig. Oft wird sie auch als „Berg und Tal“ Morphologie beschrieben. Auch in der Zellkultur kann sich der kontraktile Phänotyp in den synthetischen wandeln (Beamish et al., 2010).

1.2.2 Kontraktion

Die Kontraktion der Glattmuskelzellen erfolgt unwillentlich (Pollard und Earnshaw 2007; Alberts et al. 2015; Sweeney und Hammers 2018; Lam, Lamanna und Bourke 2019). Glattmuskelzellen können durch Calcium-abhängige Signalkaskaden aktiviert werden. Calciumionen (Ca^{2+}) sind wichtige sekundäre Botenstoffe, die an vielen Prozessen innerhalb der Zelle beteiligt sind. Nach Ausbildung eines Aktionspotentials oder durch Hormon/Neurotransmitter-Stimulation strömen Ca^{2+} durch geöffnete Ionenkanäle in das Innere der Zellen (Abbildung 2). Dadurch kommt es intrazellulär zu einem starken Anstieg der Ca^{2+} Konzentration (Kuo & Ehrlich, 2015). Durch die Depolarisierung der Glattmuskelzellmembran strömen Ca^{2+} mit Hilfe von spannungsabhängigen Calciumkanälen (VDCC) aus dem Extrazellularraum ein (Pollard und Earnshaw 2007; Alberts et al. 2015; Sweeney und Hammers 2018; Lam, Lamanna und Bourke 2019). Die erhöhte intrazelluläre Konzentration an Ca^{2+} führt daraufhin zur Aktivierung weiterer Calciumionenkanäle, den Ryanodin-Rezeptoren (RyRs) und zur Calciumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) (Lam, Lamanna und Bourke 2019). Das SR ist ein röhrenförmiges Membransystem, das dem endoplasmatischen Retikulum gleicht und in Muskelzellen der Speicherung von Ca^{2+} dient. Die Freisetzung der Ca^{2+} aus dem SR kann auch direkt nach Hormon/Neurotransmitter-Stimulation mit beispielsweise Acetylcholin, Histamin oder Angiotensin II durch Aktivierung der Phospholipase C und Wechselwirkung mit Inositoltrisphosphat (IP3) erfolgen (Lam, Lamanna und Bourke 2019). In der Zelle bindet Ca^{2+} an das regulatorische Protein Calmodulin. Durch die Bindung von Ca^{2+} ändert sich die Konformation des Calmodulins. Durch Phosphorylierung aktiviert der Ca^{2+} /Calmodulin Komplex anschließend die *myosin light chain kinase* (MLCK) (Pollard und Earnshaw 2007; Alberts et al. 2015; Sweeney und Hammers 2018; Lam, Lamanna, und Bourke 2019). Die MLCK phosphoryliert daraufhin die leichte Kette des Myosins an Position Serin (Ser)-19 (Kim et al. 2008). Es kommt zur Konformationsänderung am Myosinköpfchen, wobei das inhibierende h-Caldesmon aus dem Myosinköpfchen verdrängt wird. Durch die Aktivierung der ATPase Aktivität kann Myosin das ATP aus der Kopfdomäne in ADP und Phosphat spalten und mit Aktinfilamenten wechselwirken (Pollard und Earnshaw 2007; Alberts et al. 2015; Lam, Lamanna, und Bourke 2019). Querbrückenbindungen entstehen und Kraft wird

generiert. Diese ist relativ zur Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle. Bei der Kontraktion werden die einzelnen Aktinfilamente aufeinander zugeschoben und die Länge des Muskels verkürzt sich. Die beschriebenen Phosphorylierungen laufen in der glatten Muskulatur sehr langsam ab, wodurch es bis zur Kontraktion wenige Sekunden dauern kann (Alberts et al., 2015). Im Vergleich dazu kontrahieren Skelettmuskelzellen im Millisekundenbereich. Nimmt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ab, so wird die MLCK inaktiviert (Lam, Lamanna und Bourke 2019). Die Kontraktion der Zelle aber wird erst durch die Dephosphorylierung der leichten Kette des Myosins durch die *Myosin light chain phosphatase* (MLCP) beendet.

Die Kontraktion lässt sich abhängig vom Zellverband in den Single-Unit Typ und den Multi-Unit Typ untergliedern (Hafen und Burns 2018). Beim Single-Unit Typ sind viele einzelne Glattmuskelzellen durch Gap Junctions miteinander verbunden und kontrahieren als funktionelle Einheit gemeinsam. Der Impuls für die Kontraktion wird oft durch sogenannte Schrittmacherzellen gegeben. Diese Form des Zellverbands lässt sich in kleineren Blutgefäßen und Hohlorganen vorfinden. Beim Multi-Unit Typ sind die einzelnen Zellen nicht über Gap Junctions miteinander verbunden und kontrahieren unabhängig voneinander (Hafen und Burns 2018). Dies ist in den größeren Gefäßen und den kleineren Atemwegen zu beobachten.

Neben der Calcium-abhängigen Kontraktion gibt es die Calcium-unabhängige Kontraktion (Harnett und Biancani 2003; Sanders 2008). Bei der Calcium-unabhängigen Kontraktion phosphorylieren Ca^{2+} -unabhängige Kinasen die MLCK. Dieser Signalweg besitzt unter physiologischen Bedingungen nur wenig Relevanz.

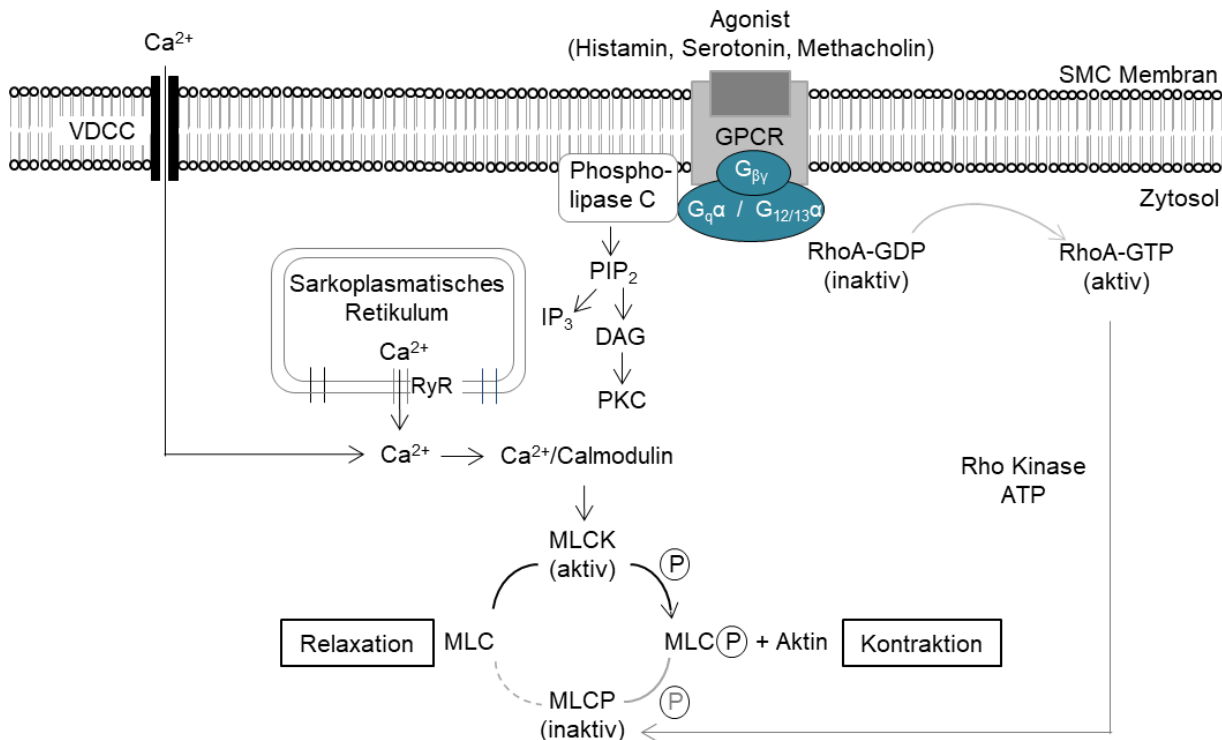


Abbildung 2: Ablauf der Kontraktion in Glattmuskelzellen. Rezeptorbindung kontraktiver Agonisten (Histamin, Serotonin, Methacholin) an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor und / oder Ausbildung des Aktionspotentials führen zur Aktivierung der Signalkaskade. Durch Öffnung der Calciumkanäle kommt es zum Influx von Ca²⁺ aus dem Extrazellularraum und dem sarkoplasmatischen Retikulum. Dies führt zur Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration. Ca²⁺ bindet an Calmodulin. Der Ca²⁺/Calmodulin Komplex kann nun die *myosin light chain kinase* (MLCK) aktivieren, die die leichte Kette des Myosins phosphoryliert und damit die ATPase Aktivität aktiviert. Quervernetzungen mit Aktin entstehen und Kraft wird generiert. Die Kontraktion wird durch Aktivierung der *myosin light chain phosphatase* (MLCP) beendet, die die leichte Kette des Myosins dephosphoryliert. (modifiziert nach Webb 2003; Lam, Lamanna und Bourke 2019)

1.3 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) sind Oberflächenrezeptoren, die Signale über GTP-bindende Proteine (G Proteine) ins Zellinnere weiterleiten (Pollard und Earnshaw 2007; Alberts et al. 2015). Unter den Oberflächenrezeptoren gehören sie mit über 800 verschiedenen Genen (Mensch) zur größten Familie (Hauser, Attwood, Rask-Andersen, Schiöth, & Gloriam, 2017). Medizinisch gesehen sind sie sehr relevant, da ungefähr 30 % aller durch die FDA zugelassenen Medikamente auf diese Protein-Superfamilie zielen (Rask-Andersen, Masuram und Schiöth 2014; Hauser et al. 2017). GPRCs beeinflussen unter anderem den Metabolismus, die Proliferation, die Differenzierung, die Bewegung und die Adhäsion von Zellen. Zu den modulierenden Signalmolekülen zählen Proteine und kleine

Peptide, Fettsäuren, Photonen des Lichts und Moleküle, die wir schmecken und riechen können (Alberts et al., 2015). Auch auf der Oberfläche von Glattmuskelzellen werden verschiedene GPCRs exprimiert (Frederick, Gregory und Evette 1999; Billington und Penn 2003; Wright et al. 2013). Therapeutisch bedeutend sind unter anderem die Histaminrezeptoren, die Muskarinrezeptoren oder die 5-Hydroxytryptaminrezeptoren.

1.3.3 Histaminrezeptoren

Bisher wurden vier verschiedene Histaminrezeptoren (H_1 - H_4) entdeckt, wobei in der Glattmuskulatur hauptsächlich die Rezeptoren H_1 und H_2 exprimiert werden (Thangam et al. 2018; Yamauchi und Ogasawara 2019). Histamin reguliert pathophysiologische aber auch physiologische Prozesse, wie beispielsweise Entzündungen, die Kontraktion der Bronchien oder die Erweiterung von Gefäßen. Es ist an der Entwicklung verschiedener allergischer Reaktionen beteiligt (Thangam et al., 2018). Dazu zählen das allergische Asthma oder der allergische Schnupfen. Histamin wird hauptsächlich in den Mastzellen produziert, aber auch Basophile und andere Immunzellen können Histamin generieren und freisetzen (Huang, Li, Liang, & Finkelman, 2018; Thangam et al., 2018).

1.3.4 Muskarinrezeptoren

In Glattmuskelzellen werden die Muskarin- oder auch muskarinischen Acetylcholinrezeptoren M_2 und M_3 exprimiert (Frederick, Gregory und Evette 1999; Buels und Fryer 2012). Diese können durch Acetylcholin oder Muskarin aktiviert werden. Bei Muskarin handelt es sich um ein Pilzgift, das auch im Fliegenpilz zu finden ist (Kosentka et al., 2013). Acetylcholin ist ein Neurotransmitter, der hauptsächlich von Nervenzellen produziert wird und unter anderem zur Stimulation von Glattmuskelzellen führt (Zholos et al., 2004). Ein Derivat des Acetylcholins ist Methacholin, dieses bindet als nicht-selektiver Agonist an Muskarinrezeptoren, wodurch es zur Bronchokonstriktion kommen kann (Frederick, Gregory und Evette 1999; Buels und Fryer 2012).

1.3.5 5-Hydroxytryptamin-Rezeptoren

Der Neurotransmitter Serotonin ist ein Bestandteil des Serums und bindet an 5-Hydroxytryptamin (5-HT) – Rezeptoren (Y. Yang et al., 2016). Hauptsächlich ist Serotonin im Magen-Darm-Trakt vorzufinden, wo es die Peristaltik der Muskulatur reguliert (Yabut et al., 2019). In den vaskulären Glattmuskelzellen reguliert Serotonin den Tonus und somit die

Kontraktion der Blutgefäße. Die Reaktion von Serotonin erfolgt größtenteils über die Rezeptoren 5-HT₁, 5-HT₂ und 5-HT₇ (Ullmer et al., 1995). Es wurden sieben 5-HT-Rezeptorfamilien nachgewiesen, wobei bis auf die 5-HT₃-Rezeptoren alle G-Protein-gekoppelt sind.

1.4 Erkrankungen der Glattmuskulatur

Da Glattmuskelzellen vielfältige Funktionen an verschiedenen Lokalisationen im Körper erfüllen, ist es naheliegend, dass sie auch an verschiedenen Erkrankungen maßgeblich beteiligt sind. So sind sie unter anderem in Atemwegserkrankungen wie Asthma oder COPD involviert, aber auch in vaskuläre Erkrankungen wie Bluthochdruck und die pulmonale Hypertonie oder inflammatorische Erkrankungen des Magen-Darm-Trakts (Berair, Hollins und Brightling 2013; Severi et al. 2014; Lam, Lamanna und Bourke 2019).

1.4.1 Erkrankungen der Atemwegsglattmuskulatur

Ein Kennzeichen vieler chronischer Lungenerkrankungen ist die Umstrukturierung (Remodeling) der Atemwege (Bush 2019; Lam, Lamanna und Bourke 2019). Diese ist gekennzeichnet durch Veränderungen in den Atemwegswänden, einer Verdickung der Basalmembran, einer erhöhten Produktion extrazellulärer Matrixproteine und der Zunahme der Glattmuskelzellmasse. Durch die Zunahme der Glattmuskelzellmasse kommt es durch die Annäherung der Atemwege zur Verengung dieser und damit verbunden zur verstärkten Atemnot. Bisher ist nicht genau bekannt wie die Zunahme der Glattmuskelzellmasse verhältnismäßig zu erklären ist. In diesem Zusammenhang werden spenderabhängig die Glattmuskelzellhypertrophie, Proliferation und Migration diskutiert (Girodet et al. 2011; Mims 2015; Lauzon und Martin 2016).

Die chronische Lungenerkrankung Asthma bronchiale (kurz: Asthma) wird durch eine Kombination aus genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen verursacht (Bara et al. 2010; Berair, Hollins und Brightling 2013; Mims 2015; Bush 2019). Verschiedene Allergene oder Reizmittel können Symptome des Asthmas hervorrufen oder verstärken. Dazu zählen Pollen, Hausstaubmilben, Infektionen der Atemwege, kalte Luft, Rauch oder Stress. Neben der Umstrukturierung ist eine Überempfindlichkeit der Atemwege (*airway hyperreactivity* - AHR) und damit verbunden eine verstärkte Kontraktilität der Atemwegsglattmuskulatur kennzeichnend für Asthma. Es wird vermutet, dass Atemwegsglattmuskelzellen der Hauptakteur bei der Entstehung der Überempfindlichkeit sind. Allerdings konnte trotz

intensiver Forschung bisher nicht geklärt werden, wodurch diese Überempfindlichkeit ausgelöst wird (Bossé et al. 2013; Lauzon und Martin 2016). Bekannt ist, dass eine Vielzahl von Reizen eine Verstärkung der Überempfindlichkeit verursachen (Berair, Hollins und Brightling 2013). Laut Weltgesundheitsorganisation sind weltweit circa 339 Millionen Menschen von Asthma betroffen (World Health Organization, 2018). Für die Behandlung von Asthma sind viele Medikamente zugelassen, jedoch bekämpfen sie meist nur die einzelnen Symptome nicht aber die Ursachen. Um die Entzündungsreaktion der Atemwege zu unterdrücken, werden oft Glukokortikoide, welche auch als Corticosteroide oder Steroide bezeichnet werden, eingesetzt (Barnes und Adcock 2009; Barnes 2010). Bei Glukokortikoiden handelt es sich um Abwandlungen des Kortisols, einem Hormon der Nebennierenrinde. In natürlichen Konzentrationen eingesetzt ist Kortisol an der Gluconeogenese und dem Protein- und Lipidstoffwechsel beteiligt. Alternativ zu den Glukokortikoiden können auch Leukotrien-Rezeptor Antagonisten als Entzündungshemmer eingesetzt werden (Mastalerz und Kumik 2010). Auch Anti-IgE Antikörper können eingesetzt werden, um den durch IgE-Antikörpern ausgelösten Entzündungsvorgang zu unterdrücken (Buhl et al., 2007). Zur Entspannung der Atemwegsmuskulatur beziehungsweise der Weitung der Bronchien werden Beta 2-Sympathomimetika verwendet (Kips und Pauwels 2001). Diese binden an Beta 2-Adrenorezeptoren und führen zur Relaxation der Atemwegsmuskulatur, was zum Ausströmen der Luft aus den Bronchien und wieder zur Normalisierung der Atmung führt. Je nach Schweregrad des Asthmas (Stufe 1-5) können eine Dauermedikation oder die Kombination mehrerer Wirkstoffe nötig sein.

Eine andere Erkrankung der Atemwegsmuskulatur ist die Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung (COPD). COPD ist durch eine chronische Bronchitis und Lungenemphysem, einer Überblähung der Lungenbläschen, gekennzeichnet (Yan et al. 2018; American Thoracic Society 2019). Circa 80 % der COPD-Patienten sind Raucher oder Ex-Raucher. Neben dem Rauchen spielen Luftverschmutzungen durch die Verbrennung biogenen Materials, die Staubbelastung durch den Kraftverkehr in Großstädten, Infektionen (zum Beispiel virale Lungenentzündungen in der Kindheit) und Vererbung eine Rolle (Gan et al. 2013; Yan et al. 2018; American Thoracic Society 2019). In 3 % der Fälle scheint eine Mutation im Alpha-1-Antitrypsin Gen zur Entstehung der Krankheit beizutragen. Die wichtigsten Symptome der COPD sind Atemnot, Husten, Auswurf (AHA-Symptome). COPD lässt sich in vier verschiedene Schweregrade einteilen. Im Schweregrad drei und vier kann es zu einer Verdopplung der glatten Atemwegsmuskulatur kommen, die mit einer Verschlechterung der Lungenfunktion korreliert (Michaeloudes et al. 2017; Yan et al. 2018). Generell hängt die Schwere der Überempfindlichkeit der Atemwege in COPD vom Grad des Remodeling-Prozesses der Atemwege und damit von der Masse an Atemwegsglattmuskel ab (Lam, Lamanna und Bourke 2019). Die Behandlung von COPD zielt darauf ab, die

Lebensqualität des Patienten zu verbessern und die Symptome zu mildern. Dabei muss das Rauchen aufgegeben werden (American Thoracic Society, 2019). Die Therapieansätze gleichen in Teilen der Behandlung von Asthma. Zur Erweiterung der Atemwege werden Beta 2- Sympathomimetika verwendet. Die Entzündungsreaktionen werden durch Glukokortikoide behandelt (Restrepo, 2007). Zur Reduktion der Entzündungsreaktion können auch Phosphodiesterase 4 (PDE4)-Hemmer verwendet werden. Wenn der Sauerstoffgehalt im Blut zu gering wird, muss Sauerstoff über die Atmung zugeführt werden.

1.4.2 Erkrankungen der vaskulären Muskulatur

Der Oberbegriff für bedeutende Erkrankungen der vaskulären Muskulatur ist die Hypertension (Brown et al., 2018; Touyz et al., 2018). Dazu zählen der Bluthochdruck (arterielle Hypertonie), aber auch die pulmonale Hypertonie (pulmonalarterielle Hypertonie) (Elliott, 2007). Charakteristisch für die systemische Hypertension ist eine Erhöhung des arteriellen Drucks durch Erhöhung des vaskulären Widerstands. Dieser resultiert aus einer erhöhten Kontraktilität der vaskulären Glattmuskelzellen und der Umstrukturierung (Remodeling) der Gefäßwand (Brown et al., 2018; Frismantiene et al., 2018). Vom Bluthochdruck spricht man bei einem systolischen Wert von über 140 mmHg und einem diastolischen Wert von über 90 mmHg (Elliott, 2007). In Deutschland leiden 20-30 Millionen Menschen am Bluthochdruck, der unbehandelt zur Entstehung der Atherosklerose und weiterhin zu Folgeerkrankungen wie Schlaganfällen oder Herzinfarkten führen kann. Auch bei der Atherosklerose, der Kalzifizierung der Gefäße, spielen vaskuläre Glattmuskelzellen eine entscheidende Rolle (Zhang et al., 2015; Allahverdian et al., 2018; Durham et al., 2018; Frismantiene et al., 2018). Sie sind in der Lage diesen aktiven und stark regulierten Prozess zu steuern. Vaskuläre Glattmuskelzellen können ihren Phänotyp stark ändern und so beispielsweise in die osteochondrale Richtung differenzieren, aber auch durch den Einfluss von LDL (Low Density Lipoprotein) die Funktionalität von Schaumzellen (Foam Cells) übernehmen (Durham et al., 2018). Schaumzellen sind im atherosklerotischen Gefäß am häufigsten vorzufinden (Allahverdian et al., 2018). Eine leichte Senkung des Bluthochdrucks kann durch Sport, Reduzierung des Körpergewichts und gesunde Ernährung erreicht werden (Nguyen et al., 2010). Medikamentös kann der Bluthochdruck durch ACE-Hemmer, Betablocker, AT1-Antagonisten, Diuretika und Calcium-Antagonisten behandelt werden. Eine weitere Erkrankung des Gefäßsystems ist die pulmonale Hypertonie. Sie betrifft ungefähr 1 % der Bevölkerung und liegt vor, wenn der Blutdruck in der Lungenschlagader in Ruhe auf mehr als 25 mmHg ansteigt (Ryan et al., 2012). Damit verbunden ist ein Anstieg des Gefäßwiderstands in den Lungenarterien, ausgelöst durch eine anhaltende Kontraktion

der Glattmuskelzellen der Pulmonalarterie (Khalil, 2010). Symptomatisch leiden Betroffene unter einer stark eingeschränkten Leistungsfähigkeit, Luftnot, Kreislaufstörungen und Müdigkeit. Die pulmonale Hypertonie wird in 5 Schweregrade unterteilt. Je nach Schweregrad der Erkrankung werden beispielsweise Calcium-Kanalblocker zum Herabsetzen der Kontraktilität eingesetzt, Phosphodiesterase Typ 5 Inhibitoren zur Relaxation der Blutgefäße, Endothelin-Rezeptor-Antagonisten zur Verringerung des pulmonalen Gefäßwiderstand sowie Sauerstoff zur Erhöhung der Sättigung verwendet (Barberà et al., 2017).

1.5 Modelle zur in-vitro Testung von Medikamenten

Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Wirkstoff zur Behandlung von Atemwegserkrankungen den Markt erreicht, liegt bei lediglich 3 % (Barnes et al. 2015). Dieser Fakt wird auch dadurch bestätigt, dass in den letzten 40 Jahren nur zwei neue Wirkstoffklassen durch die FDA zugelassen wurden: die Anti-Leukotriene und Anti-IgE Antikörper. Hinzu kommt, dass gängige Medikamente, wie die Glukokortikoide, die zur Behandlung der Atemwegserkrankungen Asthma und COPD eingesetzt werden, leider bei einigen Patienten keine Wirkung zeigen (Adcock und Mumby 2016; Dunican und Fahy 2017). Dies sowie die steigenden Zahlen an Patienten, die an Erkrankungen der glatten Muskulatur leiden, zeigen die Notwendigkeit von guten Testsystemen zur Entwicklung effizienterer Wirkstoffe. Zur Testung neuer Wirkstoffe werden verschiedene Modelle beschrieben. Die Relevanz und Aussagekraft dieser verschiedenen Modelle hängt davon ab, wie gut sie Hauptsymptome und Eigenschaften menschlicher Erkrankungen widerspiegeln können (Wright et al. 2013). Neben in-vivo Modellen, in denen beispielsweise Atemwegskontraktionen nicht richtig beobachtet werden können und ein hoher Durchsatz, der relevant für viele industrielle Fragestellungen ist, nicht gewährleistet werden kann, werden verschiedene in-vitro Modelle zu Rate gezogen (Wright et al. 2013; Lam, Lamanna und Bourke 2019). Dazu zählen beispielsweise Glattmuskelstreifen oder -ringe, die Generierung von Präzisionsschnitten oder die Verwendung von Zellkultursystemen (Wright et al. 2013; Lam, Lamanna und Bourke 2019).

Um Glattmuskelstreifen oder -ringe zu generieren werden die Glattmuskelschichten durch Mikropräparation in Streifen oder Ringen isoliert und auf einen Kraftwandler befestigt (Kullmann et al. 2014; Wright et al. 2013). In der Apparatur kann die Kontraktion durch Elektro- oder Agonisten-Stimulation ausgelöst und gemessen werden. Je nach Apparatur kann die Kraft verstärkt und auch die Längenänderung ermittelt werden (Kullmann et al.

2014). Glattmuskelstreifen oder -ringe ermöglichen eine sehr gute Analyse der Kontraktion unabhängig vom Einfluss anderer Zelltypen und sind einfach zu handhaben. Allerdings sind die Glattmuskelstreifen oder -ringe nur für Kurzzeitstudien anwendbar und der Zugang zu menschlichem Glattmuskelmateriale nur begrenzt möglich (Wright et al. 2013).

Eine andere Methode um die Glattmuskel-Physiologie und Kontraktion in den Hohlorganen nachzuweisen, ist die Generierung von Präzisionsschnitten (Sanderson 2011; Neuhaus et al. 2018; Lam, Lamanna und Bourke 2019). Dabei werden intakte Organe wie beispielsweise die Lunge mit einer Agaroselösung befüllt. Nach dem Polymerisieren der Agarose werden ausgestanzte Atemwegsbereiche mit einem Gewebeschnneider oder Vibratom in dünne Gewebeschnitte geschnitten (*Precision Cut Lung Slices* (PCLS)). So befinden sich auf jedem Schnitt die Strukturen und Zelltypen, die auch im Organismus zu sehen sind. Somit kann bei der Testung von Medikamenten die Reaktion benachbarter Zellen mitgetestet werden. Die Spannungs- und Längenänderungen der Kontraktionen können einfach mittels Lichtmikroskopie ermittelt werden. Ein weiterer Vorteil der PCLS ist die Möglichkeit der Analyse am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) (Sanderson 2011; Neuhaus et al. 2018). Somit kann parallel zur Kontraktion der Ca^{2+} -Influx durch Ca^{2+} -sensitive Farbstoffe untersucht werden. Wie auch bei den Glattmuskelstreifen und -ringen sind die Nachteile der PCLS die Verfügbarkeit, besonders von menschlichen Organen und damit verbunden der Ausgleich von Spender-Varianzen durch eine hohe Anzahl an Replikaten (Wright et al. 2013).

Eine weitere Technik um Medikamente in-vitro zu testen, ist die in-vitro Kultivierung von Zellen, die im Detail in Kapitel 1.6 beschrieben wird (Wright et al. 2013). Die in-vitro Kultivierung von Zellen ermöglicht es die Kontraktilität der Glattmuskelzellen isoliert von der Umgebung zu analysieren. Dies kann unter anderem durch *optical magnetic twisting cytometry* (OMTC) oder Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy - AFM) erfolgen. Bei der OMTC Methode werden RGD-beschichtete ferromagnetische Beads über Integrine an das Zytoskelett der Zellen gekoppelt (Zhang et al. 2018). Das Bewegen der Beads wird optisch festgehalten und ermöglicht die Ermittlung der Festigkeit des Zytoskeletts, die durch kontraktile sowie relaxierende Agonisten verändert wird. Auch das Rasterkraftmikroskop ermittelt die Festigkeit des Zytoskeletts. Hierfür werden kleine Beads in die Membranen der Zellen gepresst und damit Kraft-Eindrück-Kurven generiert. Diese Kraft-Eindrück-Kurven ändern sich bei Kontraktion und Relaxation (Sanyour et al. 2018; Zhu, He und Zhou 2018). Je nach Art der Zellkultur bieten Zellen außerdem den Vorteil von Langzeitstudien sowie die Unabhängigkeit vom frischem Spendermaterial und die einfache Handhabbarkeit (Wright et al. 2013).

1.6 Die Zellkultur

Heutzutage versteht man unter der Zellkultur eine Technik, bei der tierische oder pflanzliche Zellen aus dem Organismus extrahiert werden und unter kontrollierten Bedingungen wachsen (Schmitz 2011; Lindl und Gstraunthaler 2013; Taylor 2014). Zu diesen Bedingungen zählen physikochemische Eigenschaften wie pH, Druck und Temperatur, aber auch Gas (O_2 , CO_2) und die Zusammensetzung der Nährlösung, die wichtige Nährstoffe (Aminosäuren, Zucker, Minerale, Wachstumsfaktoren, Hormone...) für das Wachstum von Zellen enthält. Die Isolation von Zellen bringt entscheidende Vorteile und ist in der heutigen Zeit unabdingbar geworden. So ermöglicht uns die Isolation von Zellen biologische Prozesse des Körpers zu verstehen, Krankheitsmodelle nachzubilden und Medikamente damit zu entwickeln (Allen et al. 2005; Dumont et al. 2016). Durch gentechnisch veränderte Zellkulturen können rekombinante Proteine hergestellt werden (Bandaranayake und Almo 2014). Zellkulturen finden außerdem Verwendung in in-vitro Toxizitätstest, wodurch Tierversuche eingespart werden können oder werden zur Herstellung medizinischer Implantate verwendet (Allen et al. 2005; Dumont et al. 2016).

1.6.1 Primäre Zellen

Die Anfänge der Zellkultur gehen auf das Ende des 19. Jahrhunderts zurück (Schmitz 2011; Lindl und Gstraunthaler 2013; Taylor 2014). Bereits 1885 war es Wilhelm Roux möglich embryonale Hühnerzellen für sieben Tage in einer Kochsalzlösung am Leben zu erhalten. Kurze Zeit später, im Jahre 1907, entwickelte Ross Granville Harrison die Methode der „hängenden Tröpfchen“ um embryonale Nervenfasern außerhalb des Frosches in Lymphflüssigkeit zu kultivieren. Beide Männer waren Pioniere in der Isolierung primärer Zellen. Primäre Zellen sind Zellen, die durch enzymatische oder mechanische Methoden direkt aus dem Organismus entnommen werden. Bezüglich Ihrer spezifischen Eigenschaften und der Morphologie spiegeln sie am besten die Situation im Organismus wider und sind am wenigsten verändert (Schmitz 2011; Lindl und Gstraunthaler 2013). Daher werden sie oft in der Grundlagenforschung verwendet um fundamentale Fragestellungen bezüglich Zellmetabolismus, Zellmorphologie und Zelldifferenzierung zu entschlüsseln. Ein Nachteil der primären Zellen ist der Isolierungsprozess. Dieser ist sehr arbeits- und zeitaufwändig und resultiert oft in heterogenen Zellpopulationen. Zusätzlich dazu besitzen primäre Zellkulturen eine begrenzte Lebensdauer. 1961 zeigten Hayflick und Moorhead, dass primäre Zellen nur begrenzt in-vitro kultiviert werden können und nach ungefähr 50 Generationsverdopplungen seneszent werden (Hayflick und Moorhead 1961). Der Grund für die begrenzte Lebensdauer

der primären Zellen ist eine Verkürzung der Telomere (Schmitz 2011; Alberts et al. 2015; Lindl und Gstraunthaler 2013). Telomere schützen die Chromosomenenden vor enzymatischem Abbau und ermöglichen die Replikation der DNA-Endbereiche (Daniel, Peek und Tollefsbol 2012). Da die DNA-Polymerase das 3'-Ende linearer DNA nicht vollständig replizieren kann, werden diese Bereiche schrittweise verkürzt, bis sie eine kritische Länge erreichen. Ein anderer Grund, der in Bezug auf die Entstehung der Seneszenz diskutiert wird, sind ungünstige Kultivierungsbedingungen, die zum „Kultur Schock“ führen (Lindl und Gstraunthaler 2013). Durch die Isolierung der Zellen aus ihrer natürlichen Umgebung stoppen sie die Proliferation und werden vorzeitig seneszent (Sherr und DePinho 2000). Neben der begrenzten Kultivierbarkeit sind starke Abweichungen zwischen dem Zellmaterial verschiedener Spender sowie die Verfügbarkeit des primären Materials, besonders des humanen Materials, Herausforderungen bei der Arbeit mit primären Kulturen.

1.6.2 Zelllinien

Bei der permanenten Zellkultur, welche auch als Dauerkultur bezeichnet wird, handelt es sich um Zellen, die durch Transformation verändert wurden (Schmitz, 2011). Darin sind unsterbliche Tumorzellen sowie stabil transfizierte Zellen eingeschlossen. Die meisten Tumorzellen werden aus Tumorgewebe isoliert und als Zelllinien etabliert. Aktive Transformationsversuche zielen darauf ab, primäre Zellen zu immortalisieren, sie aber nicht maligne zu transformieren oder den Phänotyp zu ändern (Lindl und Gstraunthaler 2013). Aufgrund der unbegrenzten Teilungsrate sind immortalisierte Zellen ständig verfügbar, wodurch Experimente über einen langen Zeitraum möglich sind (Schmitz 2011; May, Hauser und Wirth 2012). Sie sind konsistent in ihren Eigenschaften, wodurch die Reproduzierbarkeit von Experimenten gewährleistet wird. Weiterhin zeigen Zelllinien weniger Ansprüche bezüglich der Kultivierungsbedingungen im Vergleich zu den primären Zellen. Ein kritischer Aspekt von Zelllinien sind Chromosomenabberationen und ein oft veränderter Phänotyp im Vergleich zu den Primärkulturen. Am häufigsten wird die Transformation durch in-vitro Infektion mit Viren durchgeführt (Schmitz 2011; Lindl and Gstraunthaler 2013). Dabei werden mit Hilfe von Viren virale Onkogene, wie beispielsweise das Simian-Virus 40 (SV40) Large-T-Antigen, die adenoviralen Gene E1A und E1B, Onkogene des Epstein-Barr-Virus oder die Gene E6 und E7 des Papillomavirus, eingeschleust. Diese viralen Onkogene führen zur Inaktivierung der Tumorsuppressoren pRb und p53, was meist mit einem stark veränderten Zellphänotyp einhergeht (Smeets et al. 2011). Bei beiden Proteinen handelt es sich um wichtige Zellzyklusregulatoren (Alberts et al. 2015). Das Retinoblastom-Protein (pRb) bindet und inhibiert den Transkriptionsfaktor E2F (Uchida 2016). Damit schützt es die Zelle davor

beschädigte DNA zu replizieren. Außerdem rekrutiert pRb Histon-Deacetylasen. Durch die kompakte DNA wird die Expression weiterer Proteine, die für den Zellzyklusfortlauf nötig wären, verhindert. Der Transkriptionsfaktor p53 ist für die genetische Stabilität sowie für eine Ausgewogenheit zwischen Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zelltod zuständig (Ozaki und Nakagawara 2011). Durch DNA Schäden wird p53 aktiviert und ist dann in der Lage verschiedene Target-Gene, darunter auch p21, zu aktivieren. P21 stoppt den Zellzyklus, wodurch die Zelle Zeit hat den DNA-Schaden zu reparieren. In der Hälfte aller menschlichen Tumore ist p53 mutiert und nicht mehr funktional (Pollard and Earnshaw 2007; Alberts et al. 2015). Seit einigen Jahren werden primäre Zellen mit der katalytisch aktiven Untereinheit der humanen Telomerase (hTERT) transfiziert um der replikativen Seneszenz zu entgehen, da gezeigt wurde, dass in 90 % aller Tumortypen die Telomerase aktiviert ist (Bodnar et al. 1998; Daniel, Peek und Tollefsbol 2012). hTERT ist eine reverse Transkriptase, die die Enden der Telomere wiederherstellt, wodurch eine dauerhafte Replikation möglich ist. Die Funktionalität der so generierten Zelllinien ist derer, die mittels viraler Onkogene etabliert wurden, deutlich überlegen. Allerdings können allein mit der hTERT Transfektion nicht alle Zelltypen erfolgreich immortalisiert werden (Hahn et al., 1999; Kiyono et al., 1998).

1.6.3 CI-SCREEN Immortalisierung

Der Firma InSCREENeX GmbH ist es gelungen eine universell einsetzbare Immortalisierungsmethode zu entwickeln, die CI-SCREEN Technologie, mit der neue Zelllinien aus verschiedenen Geweben und Organismen etabliert werden können (May, Hauser und Wirth 2012; Lipps et al. 2018). Ziel ist es, Zelllinien zu generieren, die in Morphologie und Funktionalität den primären Zellen gleichen. Dafür wurde eine lentivirale Genbibliothek aus 33 verschiedenen Genen zusammengestellt. Diese Gene greifen in verschiedene Signalwege ein, wie in den Fortlauf des Zellzyklus (E2F1), die Apoptose (Bcl-2), die Differenzierung (ID1, ID2, ID3) und den Erhalt von Stammzeleigenschaften (Nanog, Sox2). Auch bereits bekannte Onkogene wie TAg, E6, E7 oder Bmi1 sind darin enthalten. Durch die Verwendung von Lentiviren können auch nicht-proliferierende primäre Zellen mit einer hohen Effizienz transduziert werden (Wang et al. 2009). Die Integration der immortalisierenden Gene ins Genom erfolgt zufällig und die stabile Expression der rekombinanten Gene wird durch den SV40-Promotor gesteuert. Für die Immortalisierung von primären Zellen wird entweder die gesamte Bibliothek verwendet oder einzelne Gene daraus. Nach der Transduktion werden die Zellen bezüglich ihres Wachstums, aber auch durch eine eingebaute Resistenz gegen G418 selektiert und anschließend expandiert. Die entstandenen Zelllinien werden dann charakterisiert. Dabei wird die Integration der

immortalisierenden Viren ins Genom der Linien in Abhängigkeit vom Phänotyp untersucht. Nicht jede entstandene Linie eines Zelltyps zeigt die Integration der gleichen Gene und einen in-vivo-ähnlichen Phänotyp. Genkombinationen, die eine schonende Immortalisierung ermöglichen und mit denen sich die zelltypspezifischen Eigenschaften erhalten lassen, können für die Zell-Immortalisierung anderer Spender des gleichen Zelltyps angewandt werden. Diese müssen aber nicht notwendigerweise für einen anderen Zelltyp geeignet sein. So lassen sich zelltypabhängige Immortalisierungsprotokolle generieren. In Lipps et al. konnte dies erfolgreich an HuVEC gezeigt werden (Lipps et al. 2018). Hier wurden HuVEC mit Kombinationen aus nur drei immortalisierenden Genen (Myc, ID1 und ID2) transduziert. Die entstandenen Zelllinien zeigten die typische Endothelzellmorphologie, waren positiv für CD31 und konnten im Matrigel Gefäßstrukturen ausbilden (Lipps et al. 2018).

Mit der CI-SCREEN Technologie wurden bereits verschiedene Osteoblasten-, Hepatozyten-, Chondrozyten-, Endothel-, Epithel- und Fibroblastenzelllinien mit Primärzell-ähnlichen Eigenschaften und Funktionen generiert (Heiss et al. 2015; Selvakumar et al. 2017; Pérez-Campo et al. 2017; Lipps et al. 2018; Sapich et al. 2018). Die mit der CI-SCREEN Technologie entstandenen Zelllinien können aufgrund ihres Potentials im Bereich der Entwicklung und Testung von Medikamenten und Impfstoffen eingesetzt werden. Da es durch diese Technologie möglich ist schnell ausreichend Zellmaterial zu generieren, können bei der Entwicklung von Wirkstoffen Varianzen zwischen verschiedenen Spendern berücksichtigt und damit effizientere Wirkstoffe generiert werden.

1.7 Zielstellung der Arbeit

Für die Entwicklung neuer effizienter Medikamente, aber auch zur Klärung medizinischer und biologischer Fragestellungen werden Zellsysteme benötigt, die möglichst genau die in-vivo Situation außerhalb des Organismus widerspiegeln. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher die Generierung humaner glattmuskulärer Testsysteme mit primär-ähnlichem Phänotyp. Glattmuskelzellen sind im Körper überall vorzufinden und übernehmen eine Vielzahl von Funktionen. Dazu zählen unter anderem die Druckregulierung in den Gefäßen, die Peristaltik im Magen-Darm-Trakt, die Wehen während des Geburtsvorgangs sowie die Erweiterung der Pupillengröße. So sind sie auch an verschiedenen Erkrankungen wie Asthma, COPD und Bluthochdruck beteiligt, wodurch sie als Testsysteme für die Pharmaindustrie einen hohen Stellenwert haben. Um glattmuskuläre Testsysteme für die Entwicklung neuer Wirkstoffe zu generieren, werden in der folgenden Arbeit primäre Glattmuskelzellen von verschiedenen Lokalisationen des menschlichen Körpers mit Hilfe der CI-SCREEN Technologie immortalisiert. Dabei liegt der Fokus auf Glattmuskelzellen des Bronchus, der Aorta und der Pulmonalarterie. Um mögliche Unterschiede zwischen erkrankten und gesunden Zellen zu identifizieren und deren Mehrwert für die Wirkstoffentwicklung zu evaluieren, werden in dieser Arbeit nicht nur Zellsysteme von gesunden Spendern, sondern auch jene eines COPD Spenders generiert. Dabei sollen durch Analyse der Integration und Expression immortalisierender Gene Genkombinationen ausfindig gemacht werden, die eine Immortalisierung der Glattmuskelzellen sowie die Aufrechterhaltung wichtiger Funktionen ermöglichen. Die Aufrechterhaltung des zelltypspezifischen Phänotyps wird durch Genexpressionsanalysen sowie immunzytochemische Färbungen auf Glattmuskel-relevante Marker analysiert. Zusätzlich sollen mittels 3D-Kultivierung und verschiedener Medienzusätze die optimalen Kultivierungsbedingungen für die generierten Testsysteme gefunden werden. Eine sehr bedeutende Funktion der Glattmuskelzellen ist die Kontraktion. Diese wird auf molekularer Ebene durch die Ausschüttung von Calciumionen sowie auf zellulärer beziehungsweise gewebsähnlicher Ebene nachgewiesen. Neben der Kontraktion wird für den Vergleich zwischen gesunden und erkrankten Atemwegsglattmuskelzelllinien die Wirkung eines klinisch relevanten Medikamentes, das Antihistaminikum Levocetirizin, in einem industriell relevanten Testformat untersucht. Mit den Versuchen soll die Anwendung der Glattmuskelzelllinien in den Fokus gerückt und deren Potential für die Wirkstoffentwicklung evaluiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Biologische Materialien

Tabelle 1: Biologische Materialien

| Status | Zelltyp | Spezies | Herkunft | Informationen |
|----------|-------------------------|---------|-----------------|------------------------------|
| primär | BSMC (Lot. 0000581076) | human | Lonza | 57Y, männlich, nicht-Raucher |
| primär | PASMC (Lot. 0000637964) | human | Lonza | 50Y, weiblich, Raucher |
| primär | AOSMC | human | Sigma-Aldrich | |
| primär | ASMC eines COPD Spender | human | Tissue Solution | Schweregrad 2 |
| immortal | Fibroblasten | human | InSCREENeX | |
| immortal | HuVEC | human | InSCREENeX | |

2.1.2 Chemikalien, Puffer und Reagenzien

Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien

| Chemikalien / Reagenzien | Kat.-Nr. | Hersteller |
|------------------------------|-----------|-------------------------------|
| Agarose | 840004 | Biozym |
| Calcein AM | C3100MP | Thermo Fisher Scientific |
| Chloroform | 25669 | Fluka |
| Ethanol | 8254 | J.T. Baker |
| Fluoroshield with DAPI | F6057 | Sigma-Aldrich |
| Histamin Dihydrochlorid | H7250 | Sigma-Aldrich |
| Histofix/ 4% PFA | P087.3 | Roth |
| Hyper Ladder 1Kb | BIO-33053 | Bioline |
| Isopropanol | 67-63-0 | J.T. Baker |
| Levocetirizin Dihydrochlorid | L7795 | Sigma-Aldrich |
| Methacholin Chlorid | PHR1943 | Sigma-Aldrich |
| Methanol | 67-56-1 | J.T. Baker |
| Midori Green | MG04 | Nippon Genetics European GmbH |
| Proteinase K | 1019499 | Qiagen |
| 2x Red PCR Master Mix | 302004 | Pjk GmbH |
| Serotonin Hydrochlorid | H9523 | Sigma-Aldrich |
| SsoFast Eva Green SMX | 1725204 | Biorad |
| peqGOLD TriFast | 30-20XX | Peqlab Biotechnologies GmbH |
| Triton X-100 | 39795.02 | Serva |

Tabelle 3: Puffer/Lösungen

| Puffer / Lösungen | Zusammensetzung |
|---|--|
| Phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7,2-7,4) | 27 mM KCL 140 mM NaCl 7,2 mM Na ₂ HPO ₄ in Milli-Q Wasser |
| Trypsin-EDTA Puffer | 6mM EDTA 0,1% Trypsin in PBS |
| PBS* | PBS mit 2%FBS |
| Modified Bradley's Lösung (pH 7,5) | 10 mM Tris/HCl 2 mM EDTA 10 mM NaCl 0,5 % SDS 1 mg/ml Proteinase K |
| NaAc/Ethanol | 75 mM Natriumacetat in Ethanol |

2.1.3 Medien und Medienzusätze

Tabelle 4: Grundmedien

| Grundmedien | Kat.-Nr. | Hersteller |
|---|-----------------|-------------------|
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) | 41965-039 | Gibco |
| F-12 Nut Mix (Ham's F12) | 21765-029 | Gibco |
| HuVEC Medium | INS-ME-1011 | InSCREENeX |
| SmGM-2 Medium | CC-3182 | Lonza |

Tabelle 5: Medienzusätze

| Medienzusätze | Kat.-Nr. | Hersteller |
|---|-----------------|--------------------------|
| B27 Supplement ohne Vitamin A (50x) | 11500446 | Thermo Fisher Scientific |
| Fetales Kälberserum (FCS) | F7524 | Sigma-Aldrich |
| 2 % Gelatine Coating | INS-SU-1015 | InSCREENeX |
| HEPES | 15630080 | Gibco |
| Kollagen G | L-7213 | Merck |
| Natriumpyruvat | S8636 | Sigma-Aldrich |
| Non-essential amino acids (NEAA) (100x) | 11140-035 | Gibco |
| Polybrene | TR-1003-G | Merck |
| rekombinantes humanes EGF | 100-009 | Relia Tech GmbH |
| rekombinantes humanes FGF-2 | 300-003 | Relia Tech GmbH |
| rekombinantes humanes Insulin | I2643 | Sigma-Aldrich |
| Transforming growth Factor β 1 (TGF- β 1) | 300-023 | Relia Tech GmbH |

Tabelle 6: Medienzusammensetzung

| Medium | Zusammensetzung |
|-------------------------------------|--|
| Glattmuskelzellmedium | Ham's F12/ DMEM (1:1) 5 % FBS 10 ng/mL h-EGF 10 ng/mL h-FGF-2 10 µg/mL h-Insulin |
| SmGM-2 Medium Glattmuskelzellmedium | SmBM™ Basal Medium SmGMTM-2 SingleQuots™ supplements |
| Stimulierungsmedium | Ham's F12/ DMEM (1:1) 1 % FBS 5 ng/mL TGF-β1 0,7% B27 |
| Fibroblasten-Medium | Ham's F12/ DMEM (1:1) 1 % NEAA 0,5 % HEPES 1 % Natriumpyruvat |
| HuVEC-Medium | nach Herstellerangaben |

2.1.4 Kits

Tabelle 7: Kits

| Kit | Kat.-Nr. | Hersteller |
|----------------------------------|----------|--------------------------|
| Revertaid cDNA Synthese Kit | K1622I | Life Technologies |
| Fluo-4 Direkt™ Calcium Assay Kit | F10471 | Thermo Fisher Scientific |

2.1.5 Antikörper

Tabelle 8: Antikörper

| Primäre Antikörper | Verdünnung | Kat.-Nr. | Hersteller |
|------------------------|------------|-------------|------------|
| anti-ACTA2 (Clone 1A4) | 1:500 | A2547 | Merck |
| anti-Calponin (C2687) | 1:2000 | C2687 | Merck |
| | | | |
| Sekundäre Antikörper | | | |
| rabbit anti mouse FITC | 1:500 | 315-095-045 | Dianova |
| goat anti mouse Cy3 | 1:500 | 115-165-068 | Dianova |

2.1.6 Primerpaare

Tabelle 9: PCR Primerpaare zum Nachweis der Genintegration der Immortalisierungsgene

| Gen-name | | Sequenz | Produkt-größe (bp) |
|-----------------|---------|----------------------|--------------------|
| SV40 | forward | GGAGGCCTAGGCTTTTGCAA | |
| E6 | revers | ATTCGCCCTTTTACAGCTGC | 626 |
| E7 | | GCCCATTAACAGGTCTTCCA | 404 |
| Bmi1 | | GGGCCATTTCTTCTCCAGGT | 782 |
| Nanog | | TATGGAGCGGAGCAGCATTC | 935 |
| Myc | | AGTGGGCTGTGAGGAGGTTT | 1001 |
| ID1 | | AGAAGCACCAAACGTGACCA | 980 |
| ID2 | | GCAGGCTGACAATAGTGGGA | 462 |
| ID3 | | ATGACAAGTTCCGGAGCGAG | 453 |
| Core | | ACTTTACCCACGTTGCGCGA | 487 |
| FOS | | GGATGATGCTGGGAACAGGA | 1054 |
| TA _g | | CACCTGGCAAACCTTCCTCA | 1214 |
| Rex1 | | GCGAGCTCATTACTTGCAGG | 920 |

Tabelle 10: qPCR- Primerpaare zur Ermittlung der Genexpression immortalisierender Gene

| Gen-name | | Sequenz | Produkt-größe (bp) | Spezies |
|----------|---------|--------------------------|--------------------|-----------------------|
| E6 | forward | AGAGAACTGCAATGTTTCAGGA | 186 | humanes Papilomavirus |
| | revers | ACAGCATATGGATTCCCATCTC | | |
| E7 | forward | CGTACTTTGGAAGACCTGTTAATG | 227 | humanes Papilomavirus |
| | revers | CGTACAAGGGTACCGCAATA | | |
| Bmi1 | forward | GGGTCATCAGCAACTTCATCT | 240 | Maus |
| | revers | CCCTACGAACCACTGAACAAA | | |
| Nanog | forward | TGACTCCACCAGGTGAAATATG | 219 | Maus |
| | revers | CGTACAAGGGTACCGCAATA | | |
| MYC | forward | TTGCGGAAACGACGAGAA | 179 | Human |
| | revers | TCTAAGTTACGGGAAGGGAGTA | | |
| ID1 | forward | ACAATAGTTCTGTGGGGCTGT | 182 | Human |
| | revers | CGCAATACCGGAGTACTAGC | | |
| ID2 | forward | ACCATTTTACAAGGAGGACAA | 173 | Human |
| | revers | CGTACAAGGGTACCGCAATA | | |
| ID3 | forward | CATCGACTACATTCTCGACCTG | 250 | Human |
| | revers | CCATATAACTGAAAGCCAAACAGT | | |
| Core | forward | CTTCTTGCTGGCCCTGTT | 161 | Hepatitis C Virus |
| | revers | GGAAAGCCCTACGAACCAC | | |

Tabelle 11: qPCR- Primerpaare zum Expressionsnachweis spezifischer Glattmuskelgene

| Genname | | Sequenz | Produktgröße (bp) |
|--|---------|--------------------------|-------------------|
| α smooth muscle actin (ACTA2) | forward | CACTGTCAGGAATCCTGTGA | 103 |
| | revers | CAAAGCCGGCCTTACAGA | |
| Calponin-1 (CNN1) | forward | GAGGTTAAGAACAAGCTGGCCC | 176 |
| | revers | ATCTTCTTCACGGAGCCTGG | |
| Myosin heavy chain 11 (Myh11) | forward | TTTTGCCTACGGAGAGCTGG | 218 |
| | revers | ATGTCCTCTCGTCTCTGGCT | |
| Transgelin (Sm22 α) | forward | AGGAATTGATGGAAACCACCG | 193 |
| | revers | GCGGCTCATGCCATAGGAA | |
| h-Caldesmon | forward | AACGCCAGAAGATGCCAGAA | 146 |
| | revers | GGTCGATTTGACACCACTGC | |
| Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) | forward | TGCACCACCAACTGCTTAGC | 87 |
| | revers | GGCATGGACTGTGGTCATGAG | |
| β -2-Mikroglobulin (β 2M) | forward | GTTAAGTGGGATCGAGACATGTAA | 70 |
| | revers | ATTCATCCAATCCAAATGCGGC | |

2.1.7 Verbrauchsmaterial

Tabelle 12: Verbrauchsmaterialien

| Verbrauchsmaterial | Produktname | Kat.-Nr. | Hersteller |
|---------------------|-----------------------------------|------------|--------------------------|
| Deckgläschen | Deckgläser rund 12mm | 631-0713 | Menzel-Gläser |
| Kulturflaschen | Nunclon Delta Surface T25 | 136196 | Thermo Fisher Scientific |
| | Nunclon Delta Surface T75 | | |
| Kulturplatten | Nunclon Delta Surface 6-Well | 140675 | Thermo Fisher Scientific |
| | Nunclon Delta Surface 12-Well | 150628 | |
| | Nunclon Delta Surface 24-Well | 147925 | |
| | Nunclon Delta Surface 96-Well | 147858 | |
| Mikroskopierkammern | μ -Slide 8Well Ibditreat | 80826 | Ibidi |
| Mikrotiterplatte | Nunc MicroWell 96-Well | 249570 | Thermo Fisher Scientific |
| Objektglasträger | SuperFrost plus | 6319483 | Menzel-Gläser |
| Pipettenspitzen | 20 μ L | S1111-3000 | TipOne |
| | 200 μ L | S1111-0006 | TipOne |
| | 1000 μ L | S1111-6001 | TipOne |
| Pasteurpipetten | glass, 225mm | 747715 | Brand |
| PCR Tubes | Multiply- μ Strip 0.2ml chain | 4081901 | Sarstedt |
| PCR lid | 8-Lid Chain, flat | 65.989.002 | Sarstedt |
| Reaktionsgefäße | 1,5mL Safe Seal | 72.706 | Sarstedt |
| | 2mL Safe Seal | 72.695.400 | Sarstedt |
| Röhrchen | 15mL Cellstar tubes | 188261 | Greiner Bio-one |
| | 50mL Cellstar tubes | 227261 | Greiner Bio-one |

2.1.8 Geräte

Tabelle 13: Geräte

| Gerät | Bezeichnung | Hersteller |
|-----------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| Cycler | T3 | Biometra |
| | Light Cycler 480 | Roche Life Science |
| Durchflusszytometer | FACS Calibur | Becton Dickinson |
| Einfrierbehälter | Mr. Frosty | Thermo Fisher Scientific |
| Inkubator | C200 SINB 35 | Labotect Inkubator |
| Gelelektrophorese-Kammer | Horizon 58 | Whatman |
| Mikroskop | IX2-SCP | Olympus |
| | Axio Observer A1 | Zeiss |
| | Axiovert 135 TV | Zeiss |
| | LSM 510 META | Zeiss |
| | LSM 800 | Zeiss |
| Pipetten (P20, P200, P1000) | Pipetman | Gilson |
| Pipettierhilfe | Accu-jet Pro | Brand |
| Plate reader | Multimode Reader LB 942 | Berthold Technologies |
| Spannungsgeber | EV222 | Peqlab Biotechnologies GmbH |
| Spektrophotometer | Nanodrop ND-1000 | Peqlab Biotechnologies GmbH |
| Sterilwerkbank | MAXISAFE 2020 | Thermo Fisher Scientific |
| Thermomixer | Compact | Eppendorf |
| Vortexer | Vortex Genie 2 | Bender & Hobein AG, Zürich |
| Wasserbad | GFL | Omnilab |
| Wasserdeionisierungsanlage | Milli-Q | Millipore |
| Zählkammer | Fuchs-Rosenthal | Brand GmbH |
| Zentrifuge | Fresco Biofuge | Heraeus Instruments |
| | Megafuge 1.OR | Heraeus Instruments |

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierungsbedingungen und Passagieren

Die Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte im Inkubator kultiviert. Je nach Zellwachstum wurde alle 2-3 Tage das Medium gewechselt oder die Zellen wurden bei Erreichen der Konfluenz passagiert. Dafür wurde die Zelloberfläche mit PBS gewaschen und die Zellen anschließend im Trypsin-EDTA Puffer bei 37 °C von der Kulturschale gelöst. Die Trypsinierung wurde durch Mediumzugabe gestoppt, die Zellen in der gewünschten

Konzentration in ein neues Kulturgefäß ausgesät und im Inkubator kultiviert. Die ASMC (COPD) Zellen wurden von InSCREENeX aus dem Lungengewebe eines COPD Spenders isoliert. Die restlichen primären Glattmuskelzellen wurden käuflich erworben. Die verwendeten immortalen HuVEC und Fibroblasten stammten aus der Zellbank von InSCREENeX.

2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen

Für die Aufbewahrung der Zellen wurden diese zu verschiedenen Zeitpunkten weggefroren. Dafür wurden die Zellen, wie beim Passagieren, mit Trypsin-EDTA Puffer von dem Kulturgefäß gelöst. Die Trypsinierung wurde mit Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Röhrchen überführt und die Zellen bei 1000 RPM für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet im vorgekühlten Einfriermedium resuspendiert und die Zellsuspension in Kryoröhrchen überführt. Das Einfriermedium setzte sich aus FBS und 5 % Dimethylsulfoxid (DMSO) zusammen. Zum Einfrieren wurden die Kryoröhrchen in einen Gefrierbehälter einsortiert, der das schonende Einfrieren von 1 °C/Minute erlaubt. Nach dem Einfrieren im -80 °C Gefrierschrank über Nacht wurden die Zellen zur Langzeitaufbewahrung im Stickstofftank (-196 °C) eingefroren.

Zum Auftauen der Zellen wurde die bei -80 oder -196 °C gelagerten Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Sobald die Zellsuspension aufgetaut war, wurden die Zellen im angewärmten Zellkulturmedium in die Kulturgefäße ausgesät und in den Inkubator platziert. Nach dem Adhären der Zellen, spätestens aber einen Tag nach dem Auftauen, wurde das Kultivierungsmedium gewechselt, um das DMSO aus der Kultur zu entfernen.

2.2.1.3 Stimulierung und 3D-Kultur von Zellen

Um die Expression von glattmuskelspezifischen Markerproteinen wie ACTA2 und Calponin zu steigern, wurden die Zellen unter verschiedenen Bedingungen kultiviert. Dazu zählte zum Beispiel die serumfreie Kultivierung der Zellen. Dafür wurden die Zellen in Ham's F12/DMEM mit 1 % FBS in 2D ausgesät. Zwei Tage später wurden diese mit PBS gewaschen und ohne FBS nur im Ham's F12/DMEM Medium für 10 Tage kultiviert. Eine andere Kultivierungsoption war die 3D-Kultur. Hierfür wurden die einzelnen Wells einer 96-Well-Platte mit je 100 µl einer 0,2 % Agaroselösung für 2 h beschichtet, wodurch ein Adhären der Zellen am Wellboden verhindert wurde. Nach der Beschichtung wurden 20000 Zellen pro Well in 100 µl Glattmuskelkulturmedium ausgesät und über eine Woche kultiviert. Alle 2-3 Tage wurde mit einer Pipette vorsichtig die Hälfte des Mediums abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Da die Zellen nicht am Wellboden anheften können, formten sich

Zellaggregate, die auch als Sphäroide bezeichnet werden. Die dritte Kultivierungsbedingung war die Stimulierung der Zellen mit B27 und TGF- β 1. Hierfür wurden die Zellen für bis zu 12 Tage im Stimulierungsmedium kultiviert. Dieses setzte sich zusammen aus Ham's F12/DMEM mit 1 % FBS, 5 ng/ml TGF- β 1 und 0,7 % B27. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen und Aggregate mittels Immunfluoreszenzfärbungen analysiert. Zum Teil wurde auch die Expression muskelspezifischer Gene nach Stimulierung der Zellen ermittelt.

2.2.1.4 WST-8 Assay

Um den Einfluss verschiedener Medien auf den Metabolismus der Zellen zu untersuchen, wurde der WST-8 Assay, auch Colorimetric cell viability Kit 1 (CCVK-1) genannt, durchgeführt. Bei dem Assay wird das Tetrazoliumsalz, WST-8, in das wasserlösliche, orangefarbige Formazan reduziert (Tsukatani et al., 2008). Die Reduktion wird durch Dehydrogenasen lebender, metabolisch aktiver Zellen gewährleistet und kann als Absorptionsänderung im Zellkulturüberstand spektrophotometrisch bestimmt werden. Für die Analyse wurden 5000 Zellen je 96-Well in verschiedenen Medien ausgesät. Die verwendeten Medien waren: Ham's F12/DMEM ohne FBS, Ham's F12/DMEM und 1 % FBS, Ham's F12/DMEM mit 1 % FBS und 5 ng/ml TGF- β 1, Ham's F12/DMEM mit 1% FBS und 0,7 % B27, Ham's F12/DMEM mit 1 % FBS mit 5 ng/ml TGF- β 1 und 0,7% B27 und das Glattmuskelzellmedium. Die Zellen wurden darin für vier Tage kultiviert. Nachfolgend wurde das Medium abgesaugt und durch 100 μ l frisches Medium ersetzt. Zusätzlich wurden 10 μ l CCVK-1 Lösung je Well hinzugegeben und die Zellen für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Die Absorption bei 450 nm wurde am Plattenlesegerät bestimmt. Für die Analyse der Zellzahl wurde eine Standardreihe aufgenommen. Dafür wurden 0, 100, 500, 1000, 5000, 10000 und 50000 Zellen im Ham's F12/DMEM mit 1 % FBS ausgesät und die Bildung des Formazans nach einem Tag spektrophotometrisch bei 450 nm bestimmt.

2.2.2 Lentiviren und Infektion

2.2.2.1 Produktion der Lentiviren

Für die Produktion der Lentiviren wurden vier Millionen HEK293T-Zellen in eine mittlere Platte (60 cm²) ausgesät. Nach dem Anheften wurden die Zellen mit den Helferplasmiden des Virus transient transfiziert. Dafür wurden 5,2 μ g gag/pol, 2 μ g Rev, 3 μ g VSVg und 6,8 μ g der gewünschten Expressionskassette eingesetzt. Die einzelnen Plasmide wurden mit einer 2,5 M CaCl₂-Lösung in HEBS-Puffer vermischt. Diese DNA-Mischung wurde dann tropfenweise unter Vortexen mit 300 μ l HEBS vermischt und vorsichtig mit frischem Medium

auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden über Nacht im Inkubator kultiviert und am nächsten Tag wurde der Überstand mit einem Filter (Porengröße 0,45 µm) geerntet. Der Überstand wurde bei -80 °C gelagert. Um den Titer und die Funktionalität des Überstands zu testen, wurden A549 Zellen damit transduziert. Überlebten die transduzierten Zellen die Selektion mit G418 und war die Integration des Gens ins Genom nachweisbar, so konnten die Viren für die Infektion der Glattmuskelzellen verwendet werden.

2.2.2.2 Infektion der primären Glattmuskelzellen

Primäre Glattmuskelzellen wurden für die Infektion in 12-Well-Platten ausgesät. Bei Erreichen einer Konfluenz von ungefähr 60-70 % wurden die Zellen lentiviral transduziert. Dafür wurden verschiedene Kombinationen an Viren sowie auch verschiedene Viruskonzentrationen verwendet. Generell erfolgte die Infektion mit einer Mischung von Viren und Medium im Verhältnis von 1:1. Um die Transduktionseffizienz zu steigern, wurde 1 µl Polybrene hinzugegeben und die Zellen im Inkubator für 6 h inkubiert. Anschließend wurde das alte Medium durch frisches Medium ersetzt und die Zellen weiter im Inkubator kultiviert. Fünf Tage nach der Transduktion wurde mit der Selektion der Zellen begonnen. Dafür wurden 0,2-0,3 mg/ml G418 verwendet. Die Selektionsdauer und Konzentration an G418 richtete sich nach dem Absterben der primären, nicht infizierten Zellen. Nach der erfolgreichen Selektion wuchsen im Well miteinander verbundene, homogene Zellpopulationen heran, die als Linie bezeichnet wurden.

2.2.2.3 Kumulative Populationsverdopplung

Um die kumulative Populationsverdopplung (PDL) für die einzelnen Zelllinien bestimmen zu können, wurden die Zellen nach Erreichen der Konfluenz passagiert. Dabei enthält die Passagenzahl die Information, wie oft die Zellen der Linie auf ein neues Kulturgefäß subkultiviert wurden. Die Bestimmung der PDL wurde mit Hilfe des ATCC®ANIMAL CELL CULTURE GUIDE (ATCC, 2014) berechnet (Formel 1). X_e beschreibt hierbei die Zellzahl am Ende der Kultivierungsperiode und X_b die Zellzahl zu Beginn der Kultivierungszeit. S steht für die anfängliche PDL.

Formel 1: Gleichung zur Berechnung der kumulativen Populationsverdopplung

$$PDL = 3.32 (\log X_e - \log X_b) + S$$

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Isolierung genomischer DNA

Um die Integration der immortalisierenden Gene nachzuweisen, wurde die genomische DNA isoliert. Dafür wurden die Zellen jeweils auf ein 12-Well ausgesät. Bei Konfluenz wurden die Zellen mit modified Bradley's Lösung mit Proteinase K (1:20) von der Kulturschale abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde zur Lyse der Proteine über Nacht bei 55 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die hochmolekulare Lösung auf RT gebracht und die genomische DNA mit 100 % Ethanol und 75 mM Natriumacetat für 1h bei RT gefällt. Nach dem Zentrifugieren bei 5000 RPM für 5 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit einer 70 % Ethanol-Lösung zweimal gewaschen. Dafür wurde die Lösung zum Pellet gegeben und die DNA-Ethanol-Lösung für 10 min bei RT stehen gelassen. Danach wurde der Überstand durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 5000 RPM entfernt und der Waschschrift wiederholt. Abschließend wurde das Pellet für eine Stunde bei RT getrocknet, bevor die DNA in 40 µL Eluierungspuffer für 10 min bei 37 °C auf dem Schüttler gelöst wurde.

2.2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) und Gelelektrophorese zum Nachweis der Genintegration

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung von DNA-Fragmenten mit Hilfe einer hitzebeständigen Taq-Polymerase. Neben dem Template und der hitzebeständigen Taq-Polymerase werden Nukleotide, spezifische Primerpaare, ein geeigneter Puffer und Mg^{2+} -Ionen benötigt (Tabelle 14). Die eingesetzten Primerpaare, bestehend aus dem forward Primer und dem reversen Primer, gehen aus Tabelle 9 hervor.

Tabelle 14: Zusammensetzung des PCR-Mixes zur Amplifikation spezifischer DNA Fragmente zum Nachweis integrierter Immortalisierungsgene

| Substanz | Volumen / Menge |
|----------------------|------------------|
| 2x Red PCR Mastermix | 7,5 µl |
| ddH ₂ O | 4,5 µl |
| Primer forward | 1,25 µl |
| Primer revers | 1,25 µl |
| DMSO | 0,5 µl |
| Template | 70 ng ~ 0,5-1 µl |

Für die Analyse der integrierten Immortalisierungsgene wurde das PCR-Programm aus Tabelle 15 verwendet. Der DNA-Strang wurde dabei bei 94 °C aufgespalten (Denaturierung),

dann erfolgte die Anlagerung der Primer bei 55 °C (Annealing) und die Verlängerung der Primer in 5'-3'-Richtung (Elongation) bei 72 °C. Für die exponentielle Amplifikation der DNA-Abschnitte wurden Denaturierung, Annealing und Elongation 25 mal wiederholt.

Tabelle 15: PCR-Programm zur Amplifizierung der DNA-Fragmente

| Schritt | Temperatur | Zeit | Zyklenanzahl |
|----------------------------|------------|-------|--------------|
| initiale Denaturierung | 94°C | 5 min | 1 |
| Aktivierung der Polymerase | 72°C | 7 min | |
| zyklische Denaturierung | 94°C | 30 s | 25 |
| zyklisches Annealing | 55°C | 45 s | |
| zyklische Elongation | 72°C | 100 s | |
| finale Elongation | 72°C | 7 min | 1 |
| Pause | 16°C | ∞ | |

Die negativ geladenen PCR-Produkte wurden anschließend mittels Gelelektrophorese im elektrischen Feld aufgetrennt. Dabei wird die Laufgeschwindigkeit der Fragmente durch die Fragmentgröße bestimmt. Kleinere Fragmente passieren das Gel schneller als große. Um die DNA unter UV-Licht zu detektieren, wurden 2,5 µl Midori green in das 1 % Agarose-Gel gegeben. Für die Herstellung des Gels wurden zunächst 1 % Agarose im TAE-Puffer aufgekocht und anschließend im 55 °C Schrank aufbewahrt. Das feste Gel wurde dann in die mit TAE-Puffer befüllte Elektrophoresekammer gesetzt und mit den PCR-Produkten beladen. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurde ein 1 Kb Marker verwendet. Die Auftrennung im Gel erfolgte für 22 min bei 100 V.

2.2.3.3 Isolierung der RNA

Für die Analyse der Expression spezifischer Markergene sowie der Expression der immortalisierenden Gene musste zunächst die RNA der Zellen isoliert werden. Für die Isolierung nicht-degradierter RNA ohne DNA- und Protein-Verunreinigungen wurde peqGold TriFAST verwendet. Dafür wurden Zellen der verschiedenen Linien jeweils auf ein 6-Well ausgesät. Bei Konfluenz wurde das Medium abgesaugt und 1 ml peqGold TriFAST auf die Zellschicht gegeben. Lysierte/abgelöste Zellen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben entweder für eine spätere Isolierung bei -80 °C weggefroren oder direkt verwendet. Um eine Auftrennung der Phasen zu erreichen, wurden 200 µl Chloroform zu den Proben gegeben und diese für 15 s mit der Hand geschüttelt. Nachfolgend wurden sie für 3-10 min bei RT inkubiert und bei 12000 x g für 5 min zentrifugiert. Es bildeten sich drei Phasen: die wässrige Phase, die die RNA enthielt, sowie die Interphase und die untere Phenolphase, die die DNA und Proteine

der Zellen enthielten. Die wässrige Phase mitsamt der RNA wurde vorsichtig in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit 500 µl Isopropanol gefällt. Nach der Inkubation von 5-15 min auf Eis wurden die Proben für 10 min bei 12000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit jeweils 1 ml 75 % Ethanollösung durch vortexen und anschließender 10-minütiger Zentrifugation bei 12.000 x g und 4 °C gewaschen. Abschließend wurde das Pellet über Kopf für 1-2 h unter dem Abzug getrocknet, bevor es in 20 µl Nuklease-freiem Wasser aufgenommen wurde. Mit Hilfe des Nanodrops wurde der RNA-Gehalt der Proben photometrisch bei 260 nm bestimmt. Aussagen bezüglich der Reinheit konnten durch den Quotienten aus 260 nm/280 nm und dem Quotienten aus 260/230nm gewonnen werden. Die Werte dafür sollten bei 2 (260 nm/280 nm) und zwischen 2-2,2 (260 nm/230 nm) liegen. Die isolierte RNA konnte nun bei -80 °C weggefroren werden oder direkt in cDNA umgeschrieben werden.

2.2.3.4 cDNA Synthese

Bei der cDNA Synthese wird mit Hilfe des Enzyms reverse Transkriptase die RNA in cDNA umgeschrieben und später für die PCR verwendet. Für das Umschreiben wurden 1-5 µg RNA verwendet. Zusammen mit Nuklease-freiem Wasser und 1 µl Oligo (dT)₁₈ Primern wurde die Lösung auf 12 µl aufgefüllt. Dieses Gemisch wurde für 5 min bei 65 °C inkubiert um Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen. Anschließend wurde die Probe auf Eis abgekühlt, wodurch sich die Primer anlagern konnten. Durch Zugabe von 8 µl des cDNA-Synthese Mixes (Tabelle 16) wurde das Umschreiben begonnen. Das Gemisch wurde hierfür bei 42 °C für 60 min inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Proben für 5 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend konnte die cDNA bei -80 °C weggefroren werden oder direkt zum Ansetzen der PCR verwendet werden.

Tabelle 16: Zusammensetzung des cDNA-Synthese Mixes

| Substanz | Volumen |
|--------------------------|---------|
| 5x Reaktionspuffer | 4 µl |
| Ribolock RNase Inhibitor | 1 µl |
| 10 mM dNTP Mix | 2 µl |
| RevertAid M-MuLV RT | 1 µl |

2.2.3.5 Quantitative PCR

Die quantitative PCR (qPCR), auch Real-time quantitative PCR genannt, dient der Quantifizierung von Nukleinsäuren und beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR. Durch spezifische Bindung eines fluoreszenzbasierten Farbstoffs ermöglicht sie die Messung

der Amplifikation eines Templates in Echtzeit. Das Fluoreszenzsignal steigt direkt proportional mit der Menge, der bei jedem PCR Zyklus entstandenen PCR-Produkte, an. Neben der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen können auch FRET-Sonden, die den Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) ausnutzen, verwendet werden. Für die qPCR-Analyse wurden circa 100 ng cDNA pro Ansatz eingesetzt. Dafür wurde die umgeschriebene cDNA 1:50 verdünnt. Zusätzlich wurde EvaGreen verwendet, das doppelsträngige DNA bindet und nach Bindung Fluoreszenz abstrahlt. Zur Detektion der Amplifikation ist EvaGreen dabei weitaus strahlender als SYBR Green I. Die genaue Zusammensetzung des qRT-PCR Ansatzes ist in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Zusammensetzung des qPCR-Ansatzes

| Substanz | Volumen |
|------------------------|---------|
| EvaGreen | 10 µl |
| Primer forward | 1 µl |
| Primer revers | 1 µl |
| Nuklease-freies Wasser | 3 µl |
| cDNA | 5 µl |

Als Referenzgene wurden Beta2-Mikroglobulin ($\beta 2M$) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ausgewählt. Die Proben wurden in Duplikaten auf die Platten aufgetragen und der Pipettieransatz wurde an einem anderen Tag wiederholt. Für die Analyse wurden die Platten im Light Cycler 480 platziert. Zur Vervielfältigung des Genprodukts wurden 45 Zyklen verwendet. Der Ablauf des Programms ist in Tabelle 18 aufgelistet. Die relativen Veränderungen der mRNA Level wurden mit der Light Cycler Software 480 und des Real-Time PCR Application Guides von BIO-RAD ermittelt. Dabei wurde die Expression der Gene entweder in Bezug zur Expression der zwei Referenzgene oder zur Expression der primären oder unstimulierten Zellen normalisiert.

Tabelle 18: qPCR-Programm zur Amplifikation spezifischer RNA Fragmente

| Schritt | Temperatur | Zeit | Zyklusanzahl |
|---------------------|------------|-----------|--------------|
| initiale Inkubation | 95°C | 15 min | 1 |
| Amplifikation | 95°C | 15 s | 45 |
| | 58°C | 20 s | |
| | 72°C | 30 s | |
| Schmelzkurve | 95°C | 5 s | 1 |
| | 70°C | 1 min | |
| | 95°C | andauernd | |
| Kühlung | 40°C | 30 s | 1 |

2.2.3.6 Primerdesign

Für das Designen der q-PCR Primer zum Nachweis der zelltypspezifischen Markerexpression wurde zunächst die mRNA-Sequenz (NCBI Referenz Sequenz NM) des entsprechenden humanen Gens bei NCBI Gene rausgesucht. Damit konnten bei Primer-Blast NCBI nun Primerpaare generiert werden. Die Produktgröße wurde hierfür auf 100-250 bp eingestellt. Um DNA Verunreinigungen auszuschließen, sollte das Primerpaar durch mindestens ein Intron von der dazugehörigen genomischen DNA getrennt sein. Die Primerpaare wurden anschließend über den USCS Genbrowser überprüft, um zu sehen, ob sie spezifisch binden und das gewünschte RNA Fragment amplifiziert wird oder ob sie auch noch in der DNA binden können. Zusätzlich wurde mittels des Oligoanalyzers (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) die Bildung von Hairpin-Strukturen und Homo- und Heterodimeren zwischen dem forward und dem reversen Primer untersucht. Nach dem Finden des passenden Primerpaars, wurde dieses bestellt und für die qPCR-Analyse getestet. Um Primerpaare zum Nachweis der Expression der immortalisierenden Gene zu designen, musste ausgeschlossen werden, dass durch das generierte Primerpaar mRNA von nicht transduzierten Zellen amplifiziert wird. Das bedeutet, dass primäre Zellen bereits einige der immortalisierenden Gene wie Nanog, ID1 und ID2 exprimieren können. Die Expression dieser Gene sollte von der Expression der durch die Immortalisierung eingeschleusten Gene unterschieden werden. Dafür wurden zunächst die mRNA Sequenzen bei NCBI Gene rausgesucht und mit der Vektorsequenz des Lentivirus, der für die Immortalisierung verwendet wird, miteinander verglichen (align). Dort können die Bereiche ausgewählt werden, wo kein Alignment der beiden Sequenzen stattfindet. Um die Expression der immortalisierenden Gene zu analysieren, wurde hierfür meist ein Primerpaar ausgewählt, das im kodierenden Bereich des gewünschten Gens bindet und der dazugehörige reverse Primer, der in den angrenzenden Bereichen des Vektors bindet, sodass dieser nicht in der cDNA der primären Zellen binden konnte. Das Primerdesign erfolgte hierfür über den PrimerQuest Browser (<https://eu.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>). Am Ende wurden die Primerpaare auch mit dem USCS-Browser sowie über den Oligoanalyzer überprüft. Passende Primerpaare wurden bestellt und für die qPCR-Analyse verwendet. Die Effizienzen der Primerpaare wurden, wie im Real-Time PCR Guide von BIO-RAD beschrieben, bestimmt und lagen zwischen 97 und 125 %. Dabei wird die optimale Amplifikationseffizienz von 105 % bei einigen Primerpaaren überschritten. Da ein Vergleich der Expression zwischen den Primerpaaren nicht nötig war, wurde keine Effizienzkorrektur vorgenommen.

2.2.3.7 Durchflusszytometrische Analyse der Transduktionseffizienz

Zur Bestimmung der Transduktionseffizienz wurden die primären Zellen vorab mit einem lentiviralen GFP Reporter transduziert. Die Expression von GFP wird dabei, wie auch bei den immortalisierenden Genen, vom SV40-Promotor gesteuert. Zwei Tage nach der Transduktion wurde die Effizienz der transduzierten Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Dafür wurde das Medium der Zellen abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA Puffer von der Kulturoberfläche abgelöst. Die Trypsinierung wurde mittels PBS* gestoppt und ein Teil der Zellsuspension wurde in FACS-Röhrchen überführt. Die Analyse der Zellen am FACS-Gerät erfolgte durch die CellQuest Software. Zur Auswertung der Daten wurde das Programm FlowJo verwendet. Zellschrott sowie Zellaggregate wurden durch FSC/SSC Gating aus der Auswertung ausgeschlossen.

2.2.4 Funktionale Tests

2.2.4.1 Immunfluoreszenzfärbung in 2D- und 3D-Kultur

Die Immunfluoreszenzfärbung ermöglicht den Nachweis und die Lokalisation bestimmter Antigene. Dafür wird die spezifische Bindung eines Antikörpers an ein bestimmtes Protein oder anderes Biomolekül ausgenutzt. Für die Charakterisierung der Glattmuskelzelllinien wurden die spezifischen Markerproteine ACTA2 und Calponin angefärbt. Zunächst wurden die Glattmuskelzellen in 2D auf Deckgläschen im 12-Well ausgesät. Die Kultivierung erfolgte entweder im Glattmuskelkulturmedium bis zum Erreichen der Konfluenz für drei Tage im Stimulierungsmedium mit TGF- β 1 und B27 oder für 48 h serumfrei. Anschließend wurden die Zellen fixiert. Hierfür wurde das Medium entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen entweder mit 4 % PFA oder 100 % Methanol für 10-15 min bei RT fixiert. Nachfolgend wurde die Fixierungslösung entfernt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellen wurden 0,5 % Triton in PBS verwendet und die Zellen 15 min damit bei RT behandelt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 15 min im Blockierungspuffer inkubiert. Der Blockierungspuffer setzte sich aus PBS mit 10 % FBS zusammen und soll unspezifische Antikörperbindungen verhindern. Nach dem Blockieren erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper. Dieser wurde im Blockierungspuffer verdünnt. Zellen, die mit Methanol fixiert wurden, wurden mit dem Anti-ACTA2 Antikörper, der 1:500 verdünnt wurde, inkubiert, während PFA-fixierte Zellen mit dem Anti-Calponin Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000 inkubiert wurden. Nach 2 h wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit den sekundären Antikörpern gefärbt. Dafür wurden FITC- und Cy3-markierte Anti-Maus Antikörper 1:500 im

Blockierungspuffer verdünnt. Die Färbung mit den sekundären Antikörpern erfolgte für 1 h im Dunkeln. Bei sekundären Antikörperkontrollen wurde statt des primären Antikörpers Blockingpuffer verwendet. Danach wurden die Kontrollen mit dem sekundären Antikörper gefärbt. Abschließend wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen und dann mit Mounting-Medium mit DAPI auf Objektglaträgern befestigt und über Nacht bei RT getrocknet. Die Analyse der Färbung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Für die Färbung der 3D-Aggregate wurden die Sphäroide für eine Woche kultiviert und anschließend in 96- Wells gepoolt. Abweichend von der 2D-Färbung wurden die 3D-Aggregate für 1 h fixiert, anschließend je 30 min permeabilisiert und blockiert und mit den Antikörperlösungen über Nacht inkubiert. Die Analyse der Färbung der Sphäroide erfolgte am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop.

2.2.4.2 Sprouting-Assay

Vaskuläre Glattmuskelzellen sind Bestandteil aller Gefäße des Körpers und kontrollieren den Druck und Blutfluss in den Gefäßen (Roostalu und Wong, 2018). Sie sind der Hauptzelltyp der mittleren Gefäßschicht, der *Tunica media*, und interagieren unter anderem mit Endothelzellen. Mit Hilfe des Sprouting-Assays wurde daher das Potential von PASMC und Endothelzellen in Mono- sowie Kokultur untersucht, um Gefäß-ähnliche Strukturen aufzubauen. Um die Zelltypen auseinanderhalten zu können, waren die verwendeten PASMC eGFP und die Endothelzellen RFP markiert. Für den Versuch wurden 1500 Zellen auf mit 0,2 % Agarose-beschichteten Kulturböden ausgesät und für 48 h zu Sphäroiden geformt. Für die Kokultur wurde ein Verhältnis zwischen Endothelzellen und PASMC von 10:1 gewählt. Nach 48 h Kultivierung waren stabile Sphäroide zu erkennen, die in ein Kollagengel eingebettet wurden. Zuvor wurden die Sphäroide mit Hilfe einer Pipette im 1,5 ml Reaktionsgefäß gesammelt und zum Entfernen des Mediums zentrifugiert (300 RPM, 3 min). Außerdem wurde eine Kollagenstocklösung bestehend aus acht Teilen Kollagen Typ 1, einem Teil DMEM (10x) und einem Teil 0,2 M NaOH hergestellt (Heiss et al., 2015). Diese wurde anschließend 1:1 mit dem Grundmedium gemischt. Im Falle der Kokultur setzte sich das Grundmedium aus Ham's F12/DMEM und Endothelzellmedium (1:1), 20 % FBS und 0,5 % Methylzellulose zusammen. Die Sphäroide wurden nun im Kollagengel aufgenommen (10 Sphäroide/ 500 µl) und schnell in Wells einer Ibidi-Kammer ausgesät. Nach dem Polymerisieren der Gele wurden je 100 µl Medium (Glattmuskelzellmedium und Endothelzellmedium (1:1)) auf die Geloberflächen pipettiert und die Gele bei 37 °C für 24 h inkubiert. Nach 24 h wurden die Gele am Fluoreszenzmikroskop analysiert.

2.2.4.3 Fluo-4 Calcium Assay

Die Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration nach GPCR Stimulation wurde mit Hilfe des Fluo-4 Direkt Calcium Assay Kits untersucht. Kommt es aufgrund der Stimulation der Zelle zur Ausschüttung von Calcium, so wird dies vom fluoreszierenden Calciumindikator Fluo-4 Direkt™ gebunden, wodurch sich das Fluoreszenzsignal um das circa 100 fache verstärkt. Somit kann mit diesem Assay indirekt auf das Vorhandensein wichtiger GPCRs auf der Zelloberfläche geschlossen werden und der Effekt von Agonisten oder Antagonisten untersucht werden. Für den Assay wurden 10000-20000 Zellen in Wells von Ibidi-Kammern ausgesät. Bei 90 % Konfluenz oder nach zweitägiger Kultivierung im Stimulierungsmedium wurde das Medium entfernt und durch 100 µl frisches Medium im Well ersetzt. Zusätzlich wurden 100 µl der 2X Fluo-4 Direkt™ Calcium Reagenz Beladungslösung pro Well hinzugegeben. Zum Herstellen dieser Lösung wurden 10 ml Fluo-4 Direkt™ Calcium Assay-Puffer zusammen mit 200 µl Probenecid (250 mM) zum Fluo-4 Direct™ Calcium Reagenz (Component A) gegeben. Die Lösung wurde gevortext und vor Zugabe 5 min bei RT stehen gelassen. Nach der Zugabe wurden die Zellen für 30 min bei 37 °C im Inkubator inkubiert und anschließend für weitere 30 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Proben am CLSM mit verschiedenen Konzentrationen von Histamin, Methacholin und Serotonin stimuliert. Für die Inhibition des Histaminrezeptors H1 wurden die Zellen während der Beladung mit Fluo-4 gleichzeitig mit verschiedenen Konzentrationen von Levocetirizin vorinkubiert und anschließend am Mikroskop mit verschiedenen Histaminkonzentrationen und PBS stimuliert.

Da die Erhöhung der Calciumionenkonzentration und damit die Erhöhung der Fluoreszenzintensität sehr schnell abläuft, wurden Zeitrafferaufnahmen am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop gemacht (Exzitationswellenlänge 488 nm, Emission bei 530 nm). Dafür wurden die Zellen für 90-120 s beobachtet, wobei im Sekundentakt eine Aufnahme gemacht wurde. Die Zugabe der Stimulanz erfolgte in den ersten drei Sekunden der Messung. Die Auswertung der Zeitrafferaufnahmen wurde anschließend mittels eines Makros bei ImageJ durchgeführt. Dafür wurden die Multicolorbilder in 8 bit schwarz-weiß Aufnahmen umgewandelt. Unspezifische Hintergrundsignale wurden minimiert und der Kontrast verstärkt. Anschließend wurden mit Hilfe des „Auto Thresholds“ Zellen/Bereiche für die Analyse voneinander getrennt. Für alle getesteten Linien erzielte hierbei die „Li white“-Methode die besten Abtrennergebnisse. Die abgetrennten Zellen beziehungsweise Bereiche wurden durchnummeriert und das Signal dieser Bereiche über die Zeit bestimmt. Um apoptotische Zellen oder unspezifische Partikel auszuschließen, wurden für die Analyse nur Partikel einer bestimmten Größe analysiert. Nachfolgend wurden die Werte der Fluoreszenzsignale zu den Hintergrundfluoreszenzsignalen relativiert und graphisch gegen

die Zeit aufgetragen. Dafür wurde der Mittelwert der Signale von 40 - 80 verschiedenen Zellen mittels Excel ermittelt, sowie zusätzlich die Standardabweichungen in positiver sowie negativer Richtung abgetragen. Die graphische Darstellung erfolgte mit Hilfe der Statistiksoftware R.

2.2.4.4 Kollagengel Kontraktions-Assay

Zur Bestimmung der Kontraktion wird oftmals der Kollagengel Kontraktions-Assay verwendet. Dabei werden die Zellen in ein Kollagengel eingebettet. Nach Stimulation der Zellen im Gel kommt es durch die Kontraktion der Zellen zum Zusammenziehen der Gelfläche (Sakota, Ozawa, Yamashita, Tanaka, & Inagaki, 2014). Zur Herstellung eines 55 % Kollagengels wurden Typ1 Kollagen, DMEM (5x), 0,7 M NaOH und 1 M HEPES (1:1), PBS und Medium (Ham's F12/DMEM (1:1) +1 % FBS) im Verhältnis 8,3: 2: 1,8: 1: 2 auf Eis vorsichtig miteinander vermischt. Parallel dazu wurden die Zellen für den Assay vom Kulturgefäß abgelöst, gezählt und pelletiert. Das Pellet mit der gewünschten Zellzahl wurde anschließend auf Eis in der Kollagenlösung resuspendiert. Pro Well einer 48-Well Platte wurden 400000 Zellen in 350 µl Kollagengellösung ausgesät. Nach dem Aushärten der Gele im Inkubator wurden 500 µl Medium von oben auf die Gelfläche gegeben. Die Zellen wurden anschließend für zwei Tage im Inkubator kultiviert, bevor sie mit 1 mM Histamin oder PBS stimuliert wurden. Für die Stimulation wurde zunächst das Medium abgesaugt, die Gele mittels eines Skalpells vom Wellrand gelöst und anschließend in 500 µl Medium mit der entsprechenden Histaminkonzentration oder PBS inkubiert. Die Veränderung der Gelfläche wurde über 15 min beobachtet und mittels einer Kamera festgehalten.

2.2.4.5 Anfertigung dezellularisierter Präzisionsschnitte der Schweinelunge

Um die Kontraktion der Zellen zeigen zu können, wurden die Zellen auf eine physiologische Matrix gesetzt. Dabei handelte es sich um dezellularisierte Gerüste einer Schweinelunge. Diese Gerüste wurden Dank der Expertise des Fraunhofer ITEM in Hannover unter der Leitung von Frau Dr. Susann Dehmel angefertigt. Als Ausgangsmaterial wurde eine Schweinelunge eines frisch geschlachteten Schweines beim Fleischer besorgt. Teile dieser Lunge wurden nun bei RT mit Hilfe von Schläuchen über die Trachea/Hauptbronchus mit einer 2 % Agaroselösung (40 °C) gefüllt. Dabei musste darauf geachtet werden, dass keine Gefäße reißen und die Agaroselösung hinausläuft. Nach dem Befüllen wurde die Lunge auf Eis gelegt, um die Polymerisierung der Agarose zu beschleunigen. Nach circa 40 min wurden die gefüllten Lungenbereiche mit einem Skalpell in ungefähr 3-5 cm dicke Scheiben geschnitten. Anschließend wurden aus den Scheiben im Atemwegsbereich kleinere Bereiche

ausgestanzt (ca. 8 mm breite Stanzen). Der Gewebeschneider wurde mit 400 ml gekühlter Earle's balanced salt solution (EBSS) gefüllt und die Stanzen nacheinander eingesetzt. Mit der Schneidemaschine wurden circa 300 µm dicke Schnitte der Atemwegsbereiche angefertigt. Die Schnitte wurden danach in Petrischalen (100x15 mm) transferiert. Diese wurden vorab mit 25 ml vorgewärmten phenolrotfreiem Ham's F12/DMEM (1:1) Medium mit P/S gefüllt. Die Petrischalen wurden bis zum Ende des Schneidevorgangs im Inkubator platziert. Anschließend wurden die Schnitte in 48-Well Platten überführt. Hier wurden bessere Schnitte mit Atemwegsbereichen von zerrissenen Schnitten getrennt. Jedes Well war mit 300 µl Medium gefüllt. Die für den Versuch ausgewählten Schnitte wurden in ein 50 ml Tube umgesetzt, in dem die Dezellularisierung durchgeführt wurde. Dafür wurden die Schnitte zunächst mit PBS gewaschen, bevor sie mit PBS und 1 % Triton für 1,5 h bei RT inkubiert wurden. Nach der Inkubation wurden die Schnitte so lange mit PBS gewaschen bis das PBS blasenfrei war. Dann wurden die Schnitte wieder in eine 48-Well Platte überführt und konnten nun mit Zellen besiedelt werden. Pro Schnitt wurden 100000 Zellen im Glattmuskelzell- oder Fibroblastenmedium ausgesät. Zur Besiedlung wurden BSMC, PASM, ASMC (COPD) und Fibroblasten verwendet. Am nächsten Tag wurden die Schnitte ins 24-Well überführt, wobei ab jetzt zwei Schnitte pro Well in 600 µl Glattmuskelzellmedium kultiviert wurden. Die Besiedlung der Schnitte wurde am Tag 1 und Tag 7 am konfokalen LSM 800 festgehalten. Dafür wurden die Zellen zunächst mit Calcein Acetoxymethylester (Calcein AM) gefärbt und anschließend mittels Z-Stack und Tile Scan mikroskopisch analysiert. Calcein AM ist membrangängig und kann in lebenden Zellen durch Esterasen enzymatisch in das grün-fluoreszierende Calcein umgewandelt werden. Zellen der PASM Linie wurden vorab durch lentivirale Transduktion eGFP markiert.

2.2.4.6 Messungen der Kontraktion

Zur Messung der Kontraktion wurden die besiedelten Schnitte nach 5-8 Tagen mit verschiedenen Konzentrationen von Histamin, Methacholin und Serotonin behandelt. Dafür wurden sie jeweils in mit 2 ml Medium (Ham's F12/DMEM (1:1)) befüllte, vorgewärmte Petrischalen überführt. Diese wurde auf den beheizten Objektivtisch (37 °C) des Durchlichtmikroskops gesetzt. Damit die Schnitte während der Mikroskopie im Medium nicht wegschwimmen, wurden sie mit dünnen Ringen beschwert. Mit der Software Axiovision wurde die Agonistenstimulation mit einer Konzentration über fünf bis sechs Minuten beobachtet, wobei alle 10 s eine Aufnahme gemacht wurde und die Zugabe des Agonisten nach 60 s erfolgte. Die Daten der ersten 60 Sekunden wurden als Mittelwert in einem Datenpunkt zusammengefasst. Zur Aufnahme der Kinetik wurde die Schnitte über 18 min mikroskopiert. Hier wurde die Stimulation mit der geringsten Konzentration des Agonisten

nach 60 s begonnen. Alle drei Minuten wurde die Konzentration um eine 10-er Potenz erhöht. Auf diese Weise wurde vier Konzentrationen (0,1 μM -100 μM) getestet, abschließend folgte die Nachinkubationsphase. Zur Inhibition des Histaminrezeptors H1 wurden die Schnitte für 30 min mit verschiedenen Levocetirizinkonzentrationen vorstimuliert und anschließend mit Histamin stimuliert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe eines Makros bei ImageJ. Zunächst wurde ein *Threshold* (Schwellenwert) festgelegt und die zu analysierende Fläche (z.B. die gesamte Atemwegsfläche) durch Rotfärbung von der Umgebung abgegrenzt. Zur genauen Analyse wurde die *Region of Interest* (ROI) kreisförmig eingegrenzt. Der Kreis war in allen Bildaufnahmen identisch (0s bis 300s). Anschließend wurde im Kreis mittels der Software die Pixelveränderung der roten Fläche über die Zeit ausgewertet. Die Daten konnten dann mit Excel graphisch dargestellt werden.

3. Ergebnisse

3.1 Analyse und Kultivierung primärer Glattmuskelzellen

Glattmuskelzellen kommen in verschiedenen Organen vor, wodurch ihre Funktionen vielfältig sind (Beamish et al. 2010; Hafen und Burns 2019). Während die glatte Muskulatur des Bronchus neben der Aufrechterhaltung des Lungendrucks an der Regulation von Atemwegsentzündungen beteiligt ist, sorgen Glattmuskelzellen der Arterien für die Druckregulierung in den Gefäßen. Um Glattmuskelzelllinien durch Immortalisierung zu generieren, wurde zunächst das primäre Material auf dessen Kultivierbarkeit und Infektionseffizienz hin analysiert. Hierfür wurden primäre Glattmuskelzellen des Bronchus (BSMC) sowie der Pulmonalarterie (PASMC) im spezialisierten Medium (SmGM-2; Lonza) aufgetaut und kultiviert. Primäre BSMC sowie PASMC zeigten in Passage 4 eine spindelförmige Morphologie mit Zelllängen von circa 300 µm und Zellbreiten von ungefähr 15 µm (Abbildung 3). In den frühen Passagen formten die primären Zellen unter den Kultivierungsbedingungen einen dichten konfluenten Zellrasen.

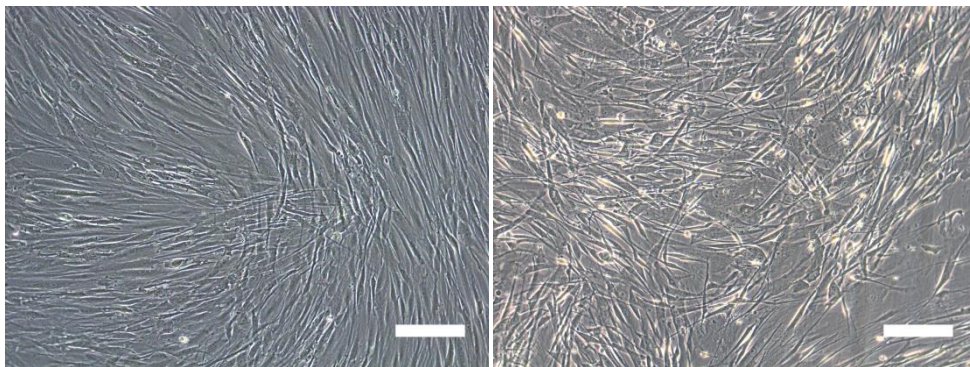


Abbildung 3: Morphologie primärer Glattmuskelzellen. Dargestellt sind die primären Zellen des Bronchus (links) und der Pulmonalarterie (rechts), jeweils in Passage 4. Messbalken 200 µm.

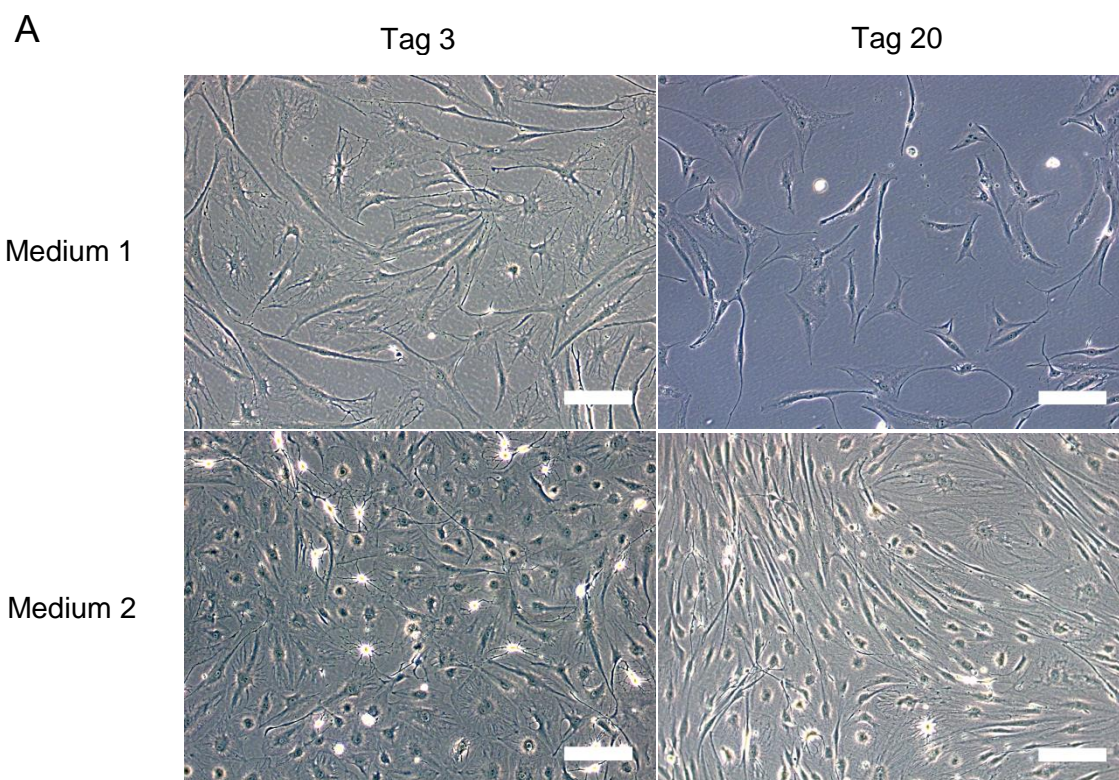
Anschließend wurden die primären Zellen für einen längeren Zeitraum kultiviert um deren proliferative Kapazität zu ermitteln. In Abbildung 4 lässt sich erkennen, dass sich die Zellmorphologie der BSMC in den Passagen 8-10 deutlich verändert hat. Neben einzelnen spindelförmigen Zellen sind zu diesem Zeitpunkt vermehrt seneszente Zellen in der Kultur zu beobachten. Auch bildete sich kein konfluenten Zellrasen mehr aus (Medium 1). Um auszuschließen, dass die Veränderungen in Morphologie und Proliferation von Medium 1 induziert wurden, wurde parallel dazu ein zweites Medium getestet. Dessen Zusammensetzung ist an ein in der Literatur oft beschriebenes Medium angelehnt (Liu et al.

2015; Wei et al. 2016; Lin et al. 2017; Shaikh et al. 2017). Ein Vorteil dieses Mediums im Vergleich zu Medium 1 ist die definierte Zusammensetzung, wodurch es gegebenenfalls optimiert werden kann (Tabelle 19).

Tabelle 19: Zusammensetzung der Glattmuskelmedien

| | | | | | |
|------------------|----------------------|---------|--------------------|----------------------|------------------------|
| Medium 1 (Lonza) | | 5 % FBS | hu-EGF | hu-FGF-B | hu-Insulin |
| Medium 2 | Ham's F12/DMEM (1:1) | 5 % FBS | 10 ng/ml hu-EGF | 10 ng/ml hu-FGF-B | 10 µg/ml hu-Insulin |

Bereits nach drei Tagen im Medium 2 zeigten die BSMC eine rundere Morphologie und schienen stärker zu proliferieren als im Medium 1, was nach 20 Tagen noch besser zu beobachten war (Abbildung 4 A). Nach 20 Tagen im Medium 2 waren viele Zellen langgezogen und spindelförmig. Auch seneszente Zellen konnten detektiert werden (Medium 2, Tag 20). Auffällig war, dass Zellen, die in Medium 1 kultiviert wurden, bereits nach fünf kumulativen Populationsverdopplungen abstarben, während Zellen aus Medium 2 mehr als doppelt so viele kumulative Populationsverdopplungen aufzeigten (Abbildung 4 B). Durchschnittlich teilten sich die Zellen in beiden Medien circa alle sieben Tage. Aufgrund der besseren Proliferationseigenschaften und der bekannten Zusammensetzung wurden für die weitere Kultivierung der Glattmuskelzellen das Medium 2 verwendet.



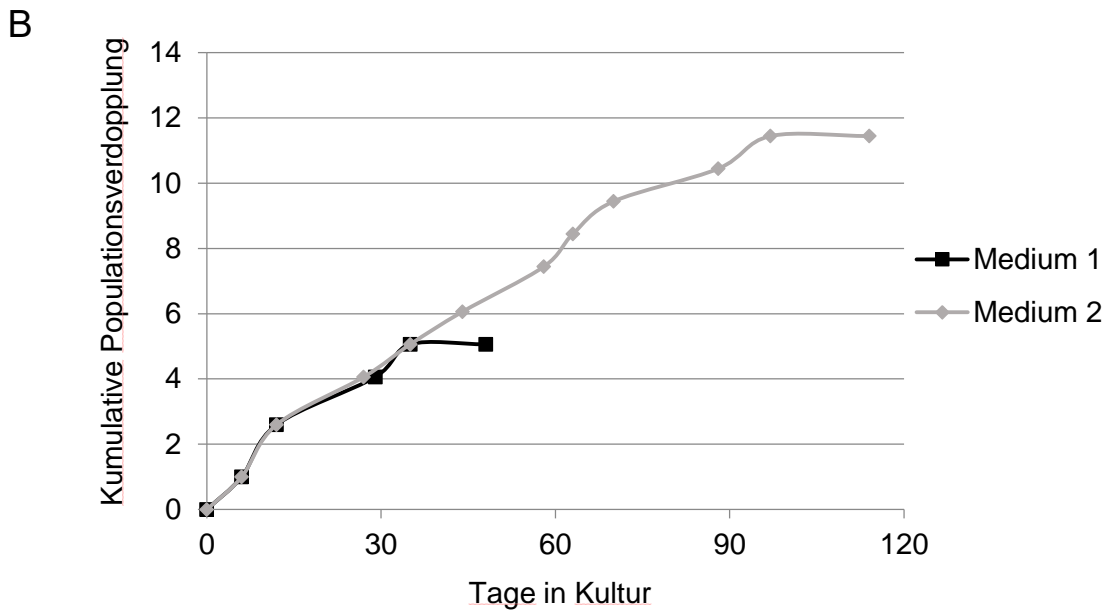


Abbildung 4: Testung zweier Kultivierungsmedien. BSMC wurden in zwei verschiedenen Medien (Medium 1 und 2) kultiviert. A) Die Morphologie wurde an Tag 3 (Passage 8) und an Tag 20 (Passage 10) mikroskopisch festgehalten. Der Messbalken beträgt 200 μm . Anhand der Morphologie (A) und der kumulativen Populationsverdopplung (B) wurden die Medien miteinander verglichen. $n=1$.

3.2 Generierung funktionaler Glattmuskelzelllinien

Für die Generierung funktionaler Glattmuskellinien wurde die CI-SCREEN Technologie verwendet. Die Basis dieser Technologie ist eine lentivirale Genbank, die aus bis zu 33 immortalisierenden Genen besteht. Durch zufällige Integration einzelner Gene ins Genom wird hierbei eine Immortalisierung erreicht. Die Expression der immortalisierenden Gene wird über den SV40 Promotor gesteuert. Um eine erfolgreiche Immortalisierung der Glattmuskelzellen zu ermöglichen, sind eine gute Transduktionseffizienz der primären Zellen sowie die Expressionsstärke der Gene Grundvoraussetzungen. Diese Faktoren wurden mittels GFP-Reporterviren getestet. Dabei handelte es sich um Lentiviren, die genauso aufgebaut sind wie die immortalisierenden Viren. Für die Bestimmung der Transduktionseffizienz wurde eine MOI (Multiplicity of infection) von 3 verwendet. Zwei Tage nach der Transduktion wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. PASMIC und BSMC konnten erfolgreich mittels des GFP-Reporterplasmids transduziert werden (Abbildung 5). Mehr als 75 % der Zellen waren positiv für GFP.

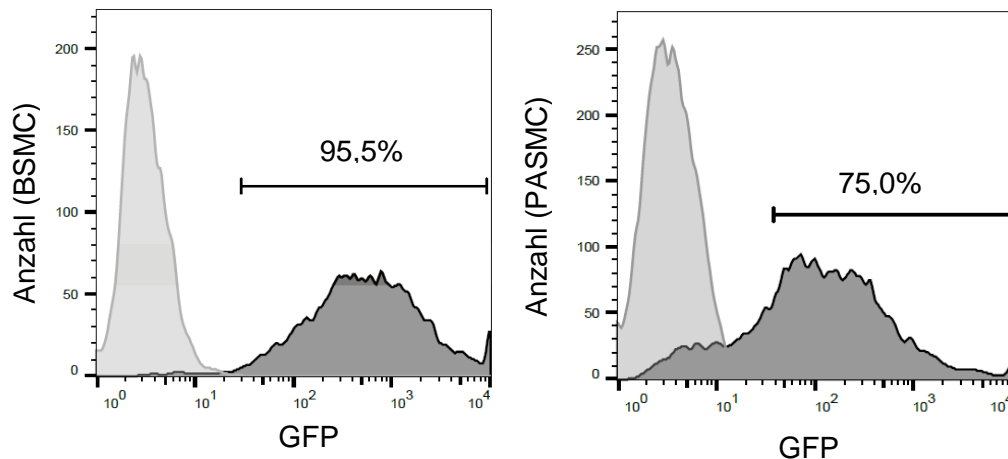


Abbildung 5: Transduktionseffizienz primärer Glattmuskelzellen. Primäre PASC und BSMC wurden mittels GFP Reporterviren transduziert. Dabei handelt es sich um lentivirale Vektoren, bei denen die GFP Expression über SV40 Promotoren gesteuert wird. Zwei Tage nach der Transduktion wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. BSMC (Links); PASC (rechts) dargestellt. n=1.

Für die Immortalisierungsansätze wurde ein Teil der 33 Gene umfassenden CI-SCREEN Genbank verwendet. Die Auswahl beinhaltete Viren, die die Gene E6, E7, Bmi1, Nanog, ID1, ID2, ID3, MYC, FOS, TAg, Rex1 und Core kodieren. Die Auswahl der Gene wurde anhand deren häufigen Integration in anderen immortalisierten Zelltypen getroffen. Beispielsweise wurde bei der Analyse von 29 Zelllinien verschiedener Zelltypen in über 50 % der Linien die Integration der Gene ID1, ID2, ID3, FOS, MYC, E7 und Nanog nachgewiesen (Lipps et al. 2018). Für die Immortalisierung wurden die Zellen im 12-Well ausgesät und mit lentiviralen Partikeln transduziert. Die MOI betrug 3. Im Anschluss an die Transduktion wurden die Zellen anhand ihrer Proliferation sowie mit Hilfe einer Resistenz gegen G418, die während der Transduktion mit in das Genom der Zellen eingebaut wurde, selektiert. Es wuchsen homogene Zellrasen heran, die expandiert wurden und in der folgenden Arbeit als Linien beschrieben werden. Sechs PASC Linien und vier BSMC Linien wurden mithilfe der lentiviralen Transduktion generiert (Abbildung 6 A). Zu Beginn der Zellexpansion ist bei den BSMC und PASC eine Lag-Phase von circa 50-60 Tagen zu erkennen. Nach dieser Anlaufphase proliferierten die Linien deutlich stärker als die primären Kontrollen. Immortalisierte PASC verdoppelten sich ungefähr alle 2-3,1 Tage, während sich die primären Zellen alle 6 Tage teilten. Die primären PASC starben nach circa acht kumulativen Populationsverdopplungen ab, wohingegen die Linien innerhalb von 80-120 Tagen 30 Verdopplungen durchliefen. Ähnliches konnte auch bei den BSMC beobachtet werden. Hier teilten sich die Linien ungefähr alle 2,2-3,5 Tage und erreichten 30 kumulative Populationsverdopplungen nach etwa 70-100 Tagen. Nach ungefähr 100 Tagen in Kultur war bei den BSMC Linien außerdem ein Abflachen im Kurvenverlauf beziehungsweise eine

Abnahme der Proliferationsaktivität zu beobachten. Die primären BSMC verdoppelten sich nur alle 7,5 Tage und starben nach 11 kumulativen Verdopplungen ab.

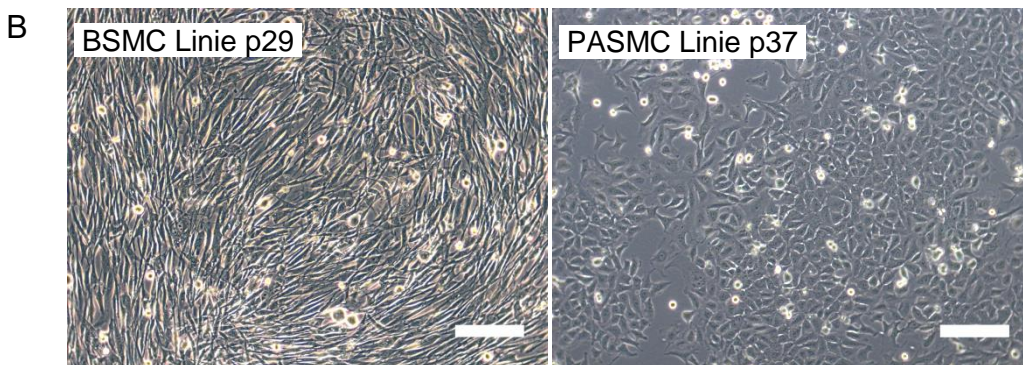
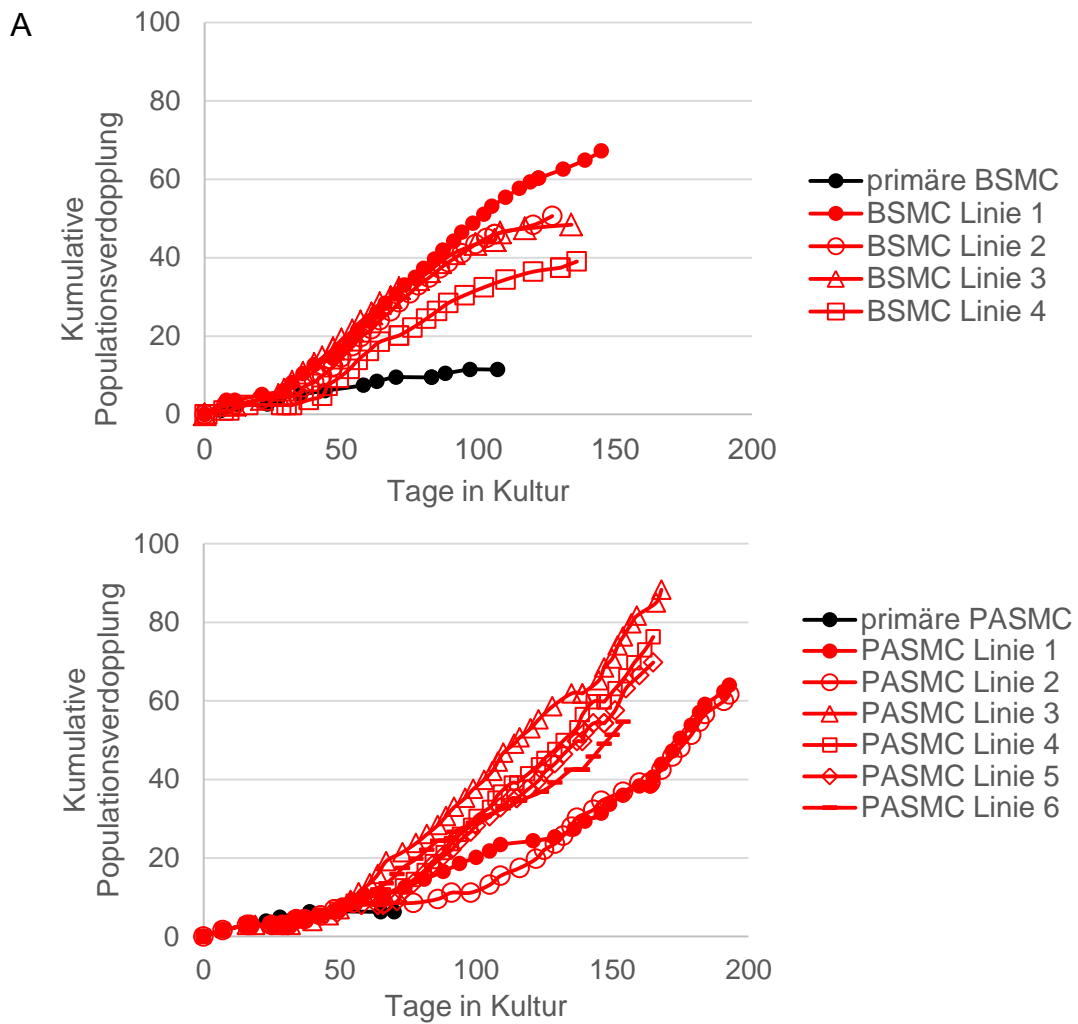


Abbildung 6: Immortalisierte PASM und BSMC. PASM und BSMC wurden erfolgreich immortalisiert. A) zeigt die kumulativen Populationsverdopplungen von verschiedenen generierten BSMC und PASM Linien. B) zeigt exemplarisch die Morphologie einer BSMC (Linie 1 p29) und einer PASM (Linie 1 p37) Linie. Messbalken 200 μm .

Abbildung 6 B stellt exemplarisch die Morphologie der generierten Zelllinien dar. Dabei lässt sich erkennen, dass die Morphologien der immortalisierten BSMC sehr ähnlich denen der

primären Zellen waren (Abbildung 3). Die Zellen wiesen eine Länge von ungefähr 250 μm auf und waren circa 14 μm breit. Etwas anders sah es für die Morphologien der PASMC aus. Hier haben die Zellen die spindelförmige Struktur verloren. Die Zellen waren sehr viel kleiner (~ 50 μm Länge und 35 μm Breite) und weisen eine dreieckige Morphologie auf.

Abbildung 7 zeigt exemplarisch die Morphologien der BSMC und PASMC zu einer frühen und späteren Passage. Dabei lässt sich feststellen, dass sich die Form der BSMC über der Zeit kaum ändert. Zellen der Passage 12 und 29 waren langgestreckt, dünn und wuchsen dicht zusammen. Die immortalisierten PASMC veränderten die Morphologie. Die Zellen der Passage 14 waren etwas größer und ausgestreckter als die der Passage 37.

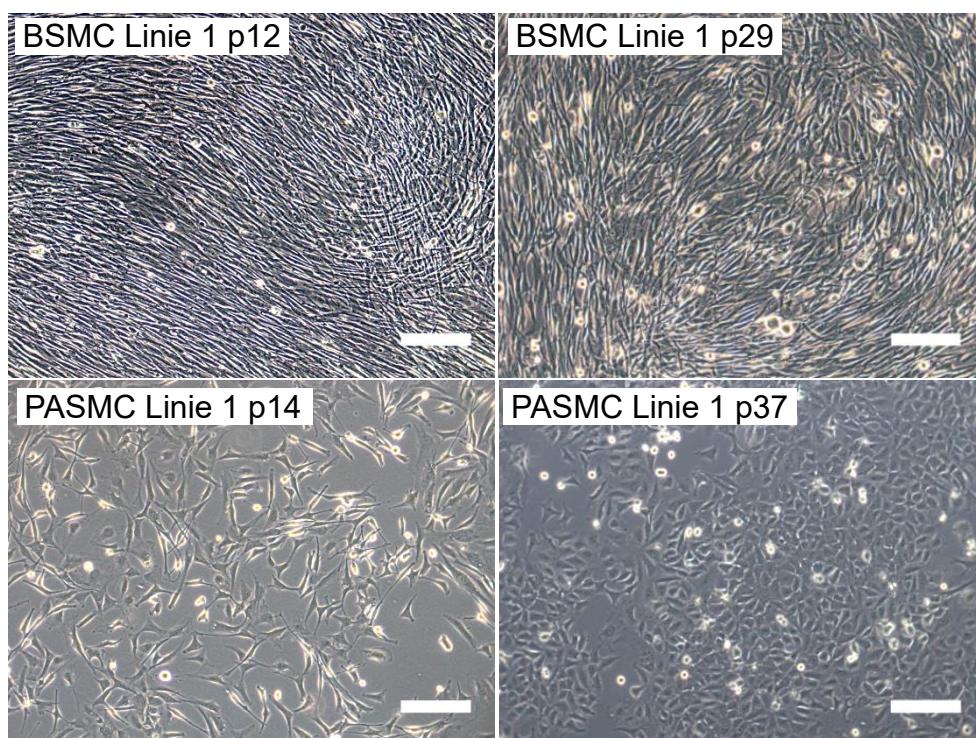


Abbildung 7: Stabilität der Morphologie. Exemplarisch sind die Morphologien einer BSMC und einer PASMC Linie über der Zeit dargestellt. Der Messbalken beträgt 200 μm .

Neben Glattmuskelzelllinien der Pulmonalarterie und des Bronchus wurden im Verlauf der Arbeit Glattmuskelzelllinien der Aorta (AoSMC) generiert. Alle primären Zellen stammten bisher von gesunden Spendern ab. Ziel dieser Arbeit war es außerdem Glattmuskelzelllinien eines erkrankten Spenders zu erzeugen, um deren Nutzen für die Entwicklung neuer Medikamente zu evaluieren. Dafür wurden Atemwegsglattmuskelzellen von einem Spender mit chronisch obstruktiver Bronchitis (COPD) aus einer Biopsie isoliert und immortalisiert. Die primären Zellen der Aorta sowie des Atemwegs (COPD) zeigten die typische spindelförmige Morphologie von Glattmuskelzellen (Abbildung 8). Die immortalisierten Zellen der Aorta

dagegen waren sichtlich kürzer im Vergleich zu den primären Zellen. Die Formen der Atemwegszelllinien des COPD Spenders (ASMC (COPD)) zeigten eine kuboidale Form ähnlich der der PASMC Linien mit Zelllängen von ungefähr 50 µm und -breiten von circa 30 µm.

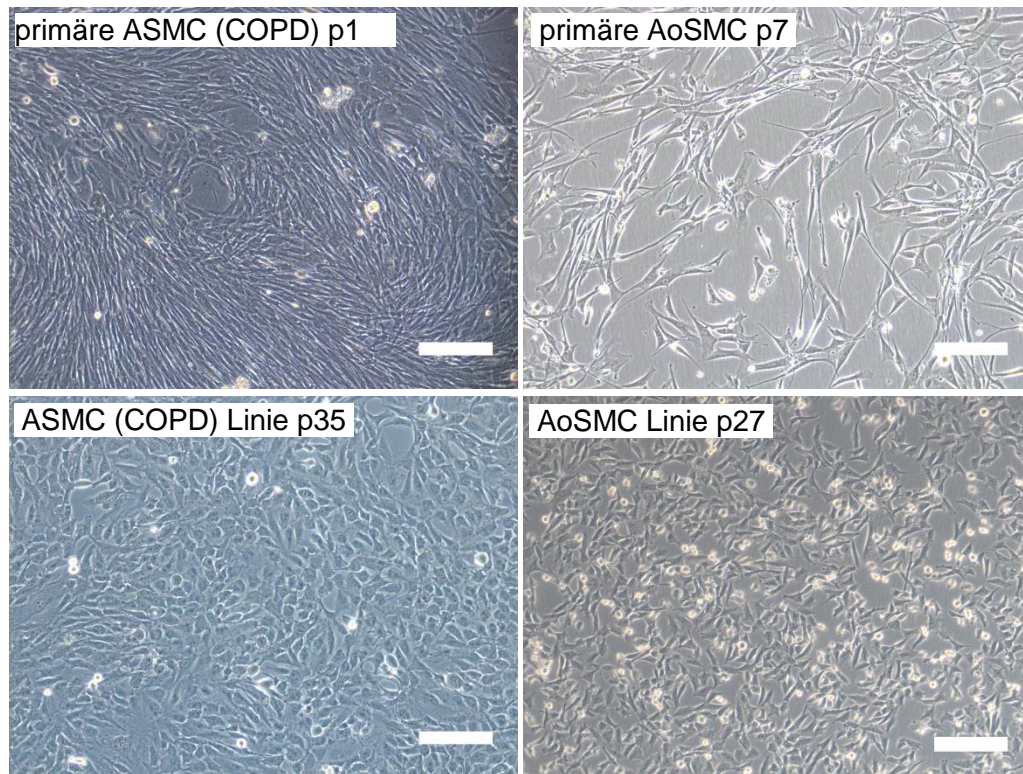


Abbildung 8: Zellmorphologien weiterer Zelllinien im Vergleich zu den primären Ausgangszellen. Die obere Reihe zeigt die primären Glattmuskelzellen der Aorta, sowie des erkrankten Atemwegs (COPD). Direkt darunter sind exemplarisch dazu die Zellformen der immortalisierten Zellen in den angezeigten Passagen abgebildet. Messbalken 200 µm.

In Abbildung 9 sind die kumulativen Populationsverdopplungen der Linien zu sehen. Auch hier ist deutlich zu erkennen, dass die Teilungsraten der primären AoSMC und der ASMC (COPD) viel geringer im Vergleich zu den Linien waren. Immortale Zellen der Aorta verdoppelten sich ungefähr alle 1,5-2 Tage, während die primären Zellen sich nicht teilten. Auch die primären ASMC (COPD) teilten sich nicht. Im Unterschied dazu replizierten sich die immortalen Zellen alle 2,5-3,5 Tage. Wie auch bei den BSMC und PASMC Linien waren bei den neu entstandenen AoSMC und ASMC (COPD) Linien Lag-Phasen von 30-50 Tagen zu erkennen.

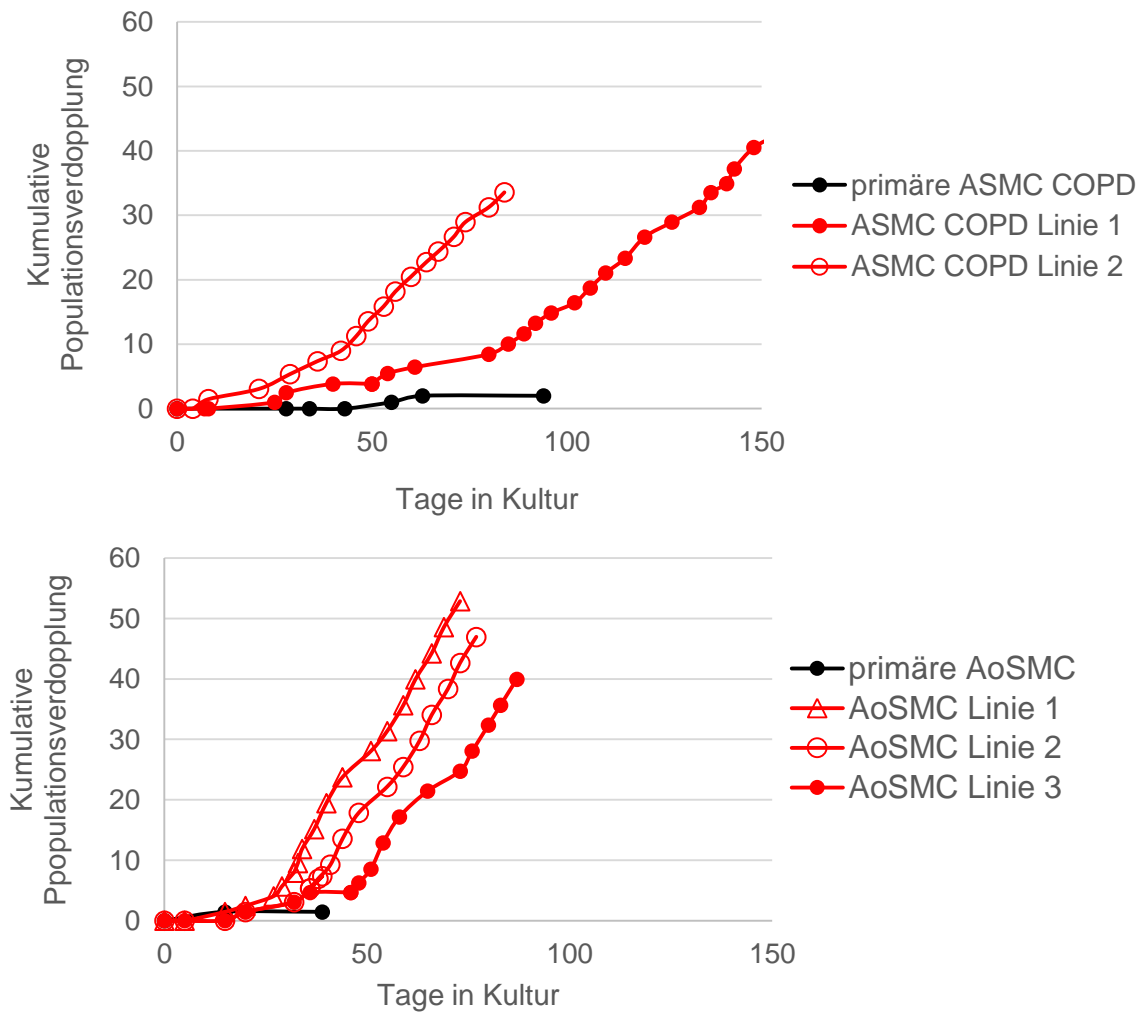


Abbildung 9: Kumulative Populationsverdopplungen verschiedener generierter Glattmuszellinien. Nach der Immortalisierung von Glattmuskelzellen der Aorta sowie des erkrankten Atemwegs (COPD) wurden die Zellen über einen Zeitraum von 100-150 Tagen in Kultur gehalten. Um die kumulative Populationsverdopplung zu bestimmen wurde das Passagier-Ratio gegen die Anzahl der Kultivierungstage aufgetragen.

Für die Immortalisierung der Glattmuskelzellen wurden bis zu 12 verschiedene immortalisierende Gene der CI-SCREEN Genbank lentiviral in die Zellen transduziert. Durch eine zufällige Integration der Gene in das Genom, wurden die Zellen unbegrenzt teilbar. Auch wenn der Integrationsprozess zufällig ist, kann genau untersucht werden, welche Gene für die Immortalisierung zuständig sein könnten. Somit könnten glattmuskelspezifische Immortalisierungskombinationen ausfindig gemacht werden. Erste Hinweise darauf gibt es in Lipps et al. (Lipps et al. 2018). Hier reichten Kombinationen der immortalisierenden Gene Myc, ID1 und ID2 für die erfolgreiche Immortalisierung. Entstandene HuVEC Zelllinien zeigten die typische Endothelzellmorphologie, waren positiv für CD31 und konnten im Matrigel Gefäßstrukturen ausbilden (Lipps et al. 2018). Um zu ermitteln, welche Gene für die

Immortalisierung der Glattmuskelzellen verantwortlich sind, wurde die DNA der Zellen isoliert und mittels PCR auf die Integration der Gene in das Genom untersucht (Abbildung 10). Exemplarisch für den Nachweis der Genintegration ist die Analyse der PASM C Linie 3 abgebildet. Dort ist die Integration der Gene E7, MYC, Nanog, ID1, ID2, ID3 und Bmi1 in das Genom zu erkennen. Als Kontrollen sind die Daten der primären PASM C, die nicht mit dem lentiviralen Mix behandelt wurden und die Wasserkontrolle dargestellt.

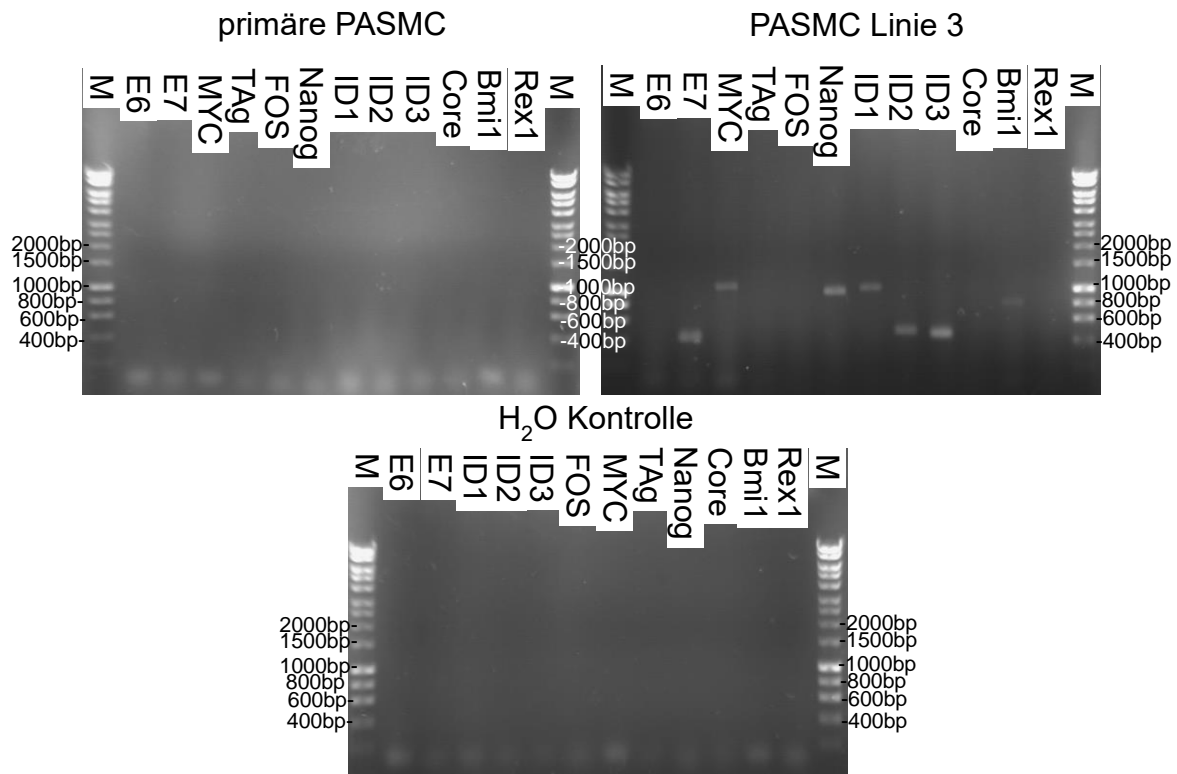


Abbildung 10: Analyse der integrierten Immortalisierungsgene. Um die Integration der immortalisierenden Gene mittels PCR zu bestimmen, wurde vorab die DNA der Zellen isoliert. Exemplarisch ist die Genintegration der PASM C Linie 3 dargestellt. Im Vergleich dazu die primäre Kontrolle der PASM C und die Wasserkontrolle. Spezifische Produktgrößen: E6 636 bp, E7 404 bp, MYC 1001 bp, TAg 1214 bp, Fos 1054 bp, Nanog 935 bp, ID1 980 bp, ID2 462 bp, ID3 453 bp, Core 487 bp, Bmi1 782 bp, Rex 920 bp. Als Marker (M) wurde ein 1 Kb Hyperladder verwendet. n=2.

Insgesamt wurden alle 15 generierten Glattmuskelzelllinien auf deren Integrationsmuster hin untersucht (Tabelle 20). Aus dem Teil der CI-SCREEN Genbank, der für die Immortalisierung verwendet wurde, wurden besonders die Gene Bmi1 (92,9%), E7 (86,7%), Nanog (73,3%), Myc (66,6%) und E6 (60%) im Genom der Linien nachgewiesen. Die Gene TAg, Rex1 und Fos wurden in keiner der getesteten Linien detektiert.

Tabelle 20: Integration der einzelnen immortalisierenden Gene in den Glattmuskellinien in Prozent.

| Gene | Bmi1 | E7 | Nanog | c-MYC | E6 | ID1 | ID2 | ID3 | Core | Rex1 | FOS | TAg |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-----|-------|-------|-----|------|------|-----|-----|
| prozentuale Integration | 92,9% | 86,7% | 73,3% | 66,6% | 60% | 58,3% | 53,3% | 50% | 9,1% | 0% | 0% | 0% |

Neben dem Nachweis der Genintegration lag ein anderer Fokus auf dem Nachweis der Expression der integrierten, immortalisierenden Gene. Dafür wurde die RNA der Zellen isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und anschließend die Genexpression mittels q-PCR bestimmt, wobei eine relative Quantifizierung gegenüber den Referenzgenen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) und β 2M (β -2Mikroglobulin) vorgenommen wurden (Abbildung 11). Die Verwendung von zwei internen Referenzgenen zur Normierung wurde gewählt, um zuverlässigere Aussagen bezüglich der Expression der Immortalisierungsgene treffen zu können (Suzuki, Higgins und Crawford 2000; Adeola 2018). β 2M und GAPDH sind in verschiedene biologische Signalwege involviert und werden oft für die relative Quantifizierung verwendet (Iser et al. 2015; Adeola 2018). Abbildung 11 stellt die normierten Expressionsdaten der Zelllinien dar. Dabei ist zu erkennen, dass für die Steigerung der Proliferation der BSMC die Expression von 2-4 immortalisierenden Genen ausreichte. Drei der BSMC Linien wiesen ein sehr ähnliches Expressionsmuster auf. Neben der Expression der Gene Bmi1 und E7, wurde in den Linien außerdem die Expression von E6 und Nanog nachgewiesen. Die Gene MYC, ID1, ID2 und ID3 wurden nicht exprimiert. Die Integration dieser Gene wurde aber auch nicht im Genom detektiert. Für die Immortalisierung der AoSMC war die Expression von 4-5 immortalisierenden Genen ausschlaggebend. Dazu zählten Bmi1, E7, Nanog, MYC und E6, wobei Myc in diesen Linien stärker exprimiert wurde, als die restlichen Gene. PASMCM Linien exprimierten mit 7-8 immortalisierenden Genen die meisten Gene. Am stärksten wurden hierbei MYC und ID2 exprimiert. Die Expression der anderen Gene war eher schwach bis mäßig stark. Für die Generierung immortaler ASMC des COPD Spenders wurde die Expression von 5-7 Genen nachgewiesen. Während in der Linie 1 eher die Gene Bmi1, E7 und MYC dominanter exprimiert wurden, war es in der Linie 2 die Expression von Nanog. Um die Spezifität der Primerpaare zu bestätigen, wurden RNA Kontrollen der primären BSMC und PASMCM mitgeführt. In diesen Kontrollen wurde kein Signal nachgewiesen. Vergleicht man die prozentualen Integrationsdaten aus Tabelle 20 mit den Expressionsdaten aus Abbildung 11 so war eine hohe Übereinstimmung zwischen integrierten und exprimierten Genen zu beobachten. Allerdings scheint die PCR auf Genintegration nicht sensitiv genug zu sein, sodass Abweichungen, wie beispielsweise bei der Expression von E6, beobachtet werden konnten. Laut Genintegration zeigten nur 9 von

15 Linien die Integration dieses Genes, exprimiert wurde es aber in 14 von 15 entstandenen Linien.

| | | relative mRNA Expression | | | | | | | |
|-------------|---------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | Bmi1 | E7 | Nanog | MYC | E6 | ID1 | ID2 | ID3 |
| BSMC | Linie 1 | 0,160 | 0,119 | 0,077 | n.d. | 0,036 | n.d. | n.d. | n.d. |
| | Linie 2 | 0,107 | 0,126 | 0,099 | n.d. | 0,020 | n.d. | n.d. | n.d. |
| | Linie 3 | 0,135 | 0,143 | 0,177 | n.d. | 0,064 | n.d. | n.d. | n.d. |
| | Linie 4 | n.d. | n.d. | 0,018 | n.d. | 0,002 | n.d. | n.d. | n.d. |
| | primäre | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| PASC | Linie 1 | 0,008 | 0,080 | n.d. | 0,302 | 0,038 | 0,012 | 0,141 | 0,078 |
| | Linie 2 | 0,024 | 0,076 | n.d. | 0,212 | 0,056 | 0,009 | 0,157 | 0,058 |
| | Linie 3 | 0,021 | 0,047 | 0,017 | 0,210 | 0,024 | 0,001 | 0,042 | 0,076 |
| | Linie 4 | 0,002 | 0,006 | n.d. | 0,011 | 0,001 | 0,001 | 0,003 | 0,006 |
| | Linie 5 | 0,029 | 0,061 | 0,030 | 0,305 | 0,072 | 0,007 | 0,037 | 0,044 |
| | Linie 6 | 0,009 | 0,012 | 0,006 | 0,057 | 0,001 | 0,001 | 0,017 | 0,021 |
| | primäre | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| AoSMC | Linie 1 | 0,026 | 0,092 | 0,046 | 0,202 | 0,007 | n.d. | n.d. | n.d. |
| | Linie 2 | 0,026 | 0,098 | 0,048 | 0,216 | 0,007 | n.d. | n.d. | n.d. |
| | Linie 3 | 0,005 | 0,027 | n.d. | 0,092 | 0,002 | n.d. | n.d. | n.d. |
| ASMC (COPD) | Linie 1 | 0,144 | 0,302 | 0,096 | 0,107 | n.d. | 0,030 | 0,290 | 0,004 |
| | Linie 2 | 0,029 | 0,087 | 0,105 | n.d. | 0,013 | n.d. | n.d. | 0,007 |

0,1-0,5 stark exprimiert

0,01-0,1 mäßig stark exprimiert

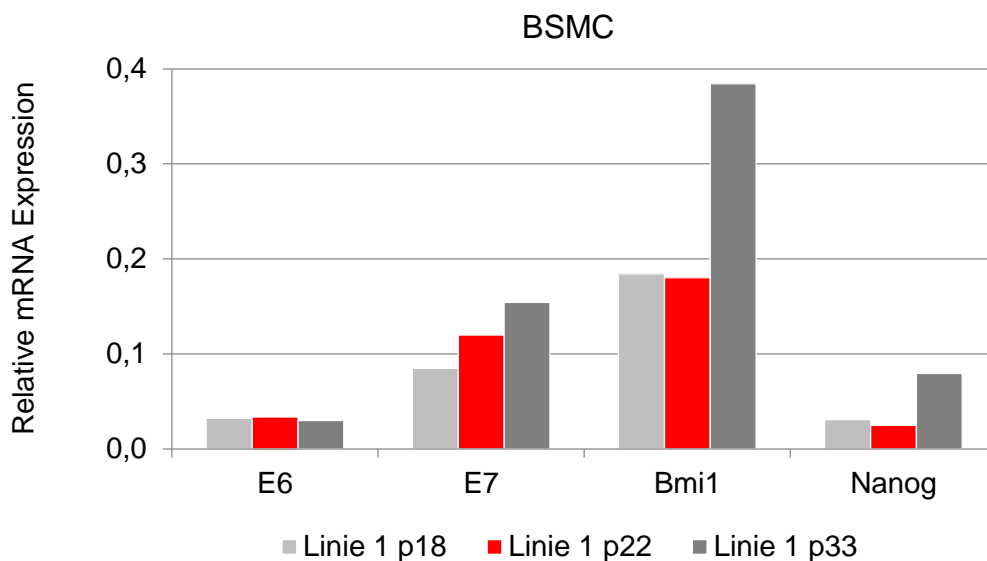
0,001-0,01 schwach exprimiert

n.d. keine Expression detektiert

Abbildung 11: Relative Genexpression der integrierten Immortalisierungsgene. Die Genexpression der immortalisierenden Gene wurde mittels q-PCR bestimmt und zu den Referenzgenen GAPDH und β 2M normiert. Zuvor wurde die RNA der Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Abgebildet sind die relativen Expressionen der Gene, die in mindestens 50 % der Linien integriert wurden. Es wurden die Expressionen aller Linien und der primären BSMC und PASC Kontrollen untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2-3 unabhängigen Experimenten. Ausnahme: n=1 bei AoSMC und ASMC (COPD) Linien.

Die stabile Expression der immortalisierenden Gene ist ein wesentliches Merkmal von Zelllinien. Daher wurde im nächsten Versuch die Expression der Gene über verschiedene

Passagen beobachtet. Dies sollte Aufschluss über mögliche Schwankungen in der Expression der immortalisierenden Gene über die Zeit geben. Für die Analyse wurde zu drei verschiedenen Zeitpunkten die RNA der Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Genexpression mittels q-PCR ermittelt. Repräsentativ sind die Daten einer BSMC und einer PASM C Linie dargestellt (Abbildung 12). Die Ergebnisse der BSMC zeigten über die Passagen 18, 22 und 33 die Expression der Gene E6, E7, Bmi1 und Nanog. Außerdem war zu beobachten, dass die Expressionshöhen in den Passagen 18 und 22 nahezu gleich waren, während die Expressionen von Bmi1 und Nanog in Passage 33 um das 2-2,5-fache anstiegen. Die PASM C zeigten in den Passagen 28 und 47 sehr ähnliche Expressionshöhen aller Gene (E6, E7, Bmi1, ID1, ID2, ID3, MYC). Auffällig war jedoch, dass Zellen der Passage 13 lediglich die Gene E7 und Nanog exprimierten. Dies lässt sich möglicherweise durch die Expansion der Zellen nach der Immortalisierung erklären. Möglicherweise war zu Beginn der Zellexpansion eine Zellpopulation, die die Gene E7 und Nanog exprimierte, sehr präsent, jedoch wurde diese über die Zeit von einer anderen Zellpopulation überwachsen.



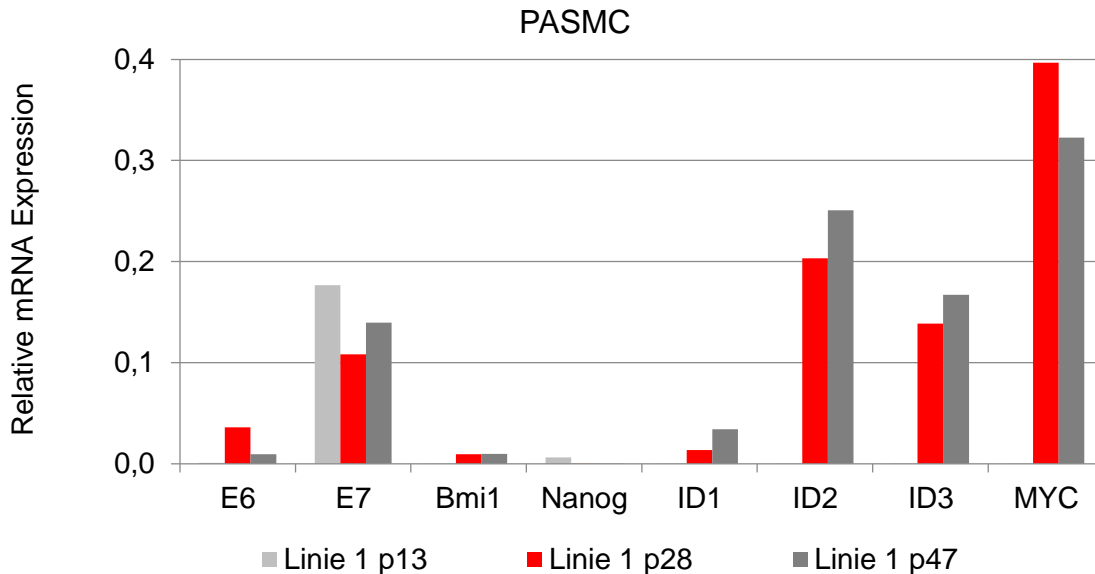


Abbildung 12: Genexpression über der Zeit. Um die Variation der Genexpression über der Zeit zu ermitteln, wurde zu drei verschiedenen Zeitpunkten die RNA der Zellen isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und mittels q-PCR analysiert. Beispielhaft sind die Ergebnisse einer PASMC und BSMC Linie abgebildet. Die Expressionen wurden gegen die der Referenzgene GAPDH und β 2M relativiert. n=1.

Ein weiterer wichtiger Ansatz dieser Arbeit war die Reduktion der immortalisierenden Gene für eine gezieltere, kontrollierbare Immortalisierung. Dabei sollte ein kleines Set an Genen, das sich bereits als wichtig für die Immortalisierung von Glattmuskelzellen gezeigt hat, Verwendung finden (siehe Tabelle 20). So sollte stets die Immortalisierung der Glattmuskelzellen garantiert werden, sowie auch Rückschlüsse auf den Erhalt des Phänotyps gezogen werden können. Bisher wurden für die Generierung der Glattmuskelzelllinien die Gene E6, E7, Nanog, Bmi1, MYC, ID1, ID2, ID3, FOS, TAg, Rex1 und Core verwendet. Wie die Daten aus Tabelle 20 zeigen, wurden dabei prozentual am häufigsten die Gene E7, Nanog und Bmi1 ins Genom integriert. Auch Myc, E6 und Id2 wurden oft integriert. Somit wurden für die Reduktion der immortalisierenden Gene, verschiedene Genkombinationen ausprobiert (Tabelle 21). Trotz verschiedener verwendeter Genkombinationen und Ansätzen, konnten jedoch keine Zelllinien generiert werden. Alle infizierten Zellen starben entweder während der Selektion oder während der Kultivierung ab. Die Ursachen hierfür können vielfältig sein. So handelte es sich teilweise um neue Spender, aber auch um Zellen anderer Lokalisationen, die bezüglich der Immortalisierung miteinander verglichen wurden. Außerdem sollte in Betracht gezogen werden, dass sich Zellen erkrankter Spender bei der Generierung von Immortalisierungsprotokollen von ihren gesunden Gegenspielern unterscheiden können. Die Verwendung von 4-5 Genen war bisher nur erfolgreich für die Infektion gesunder BSMC und AoSMC.

Tabelle 21: Immortalisierungsansatz mit reduzierter Genauswahl.

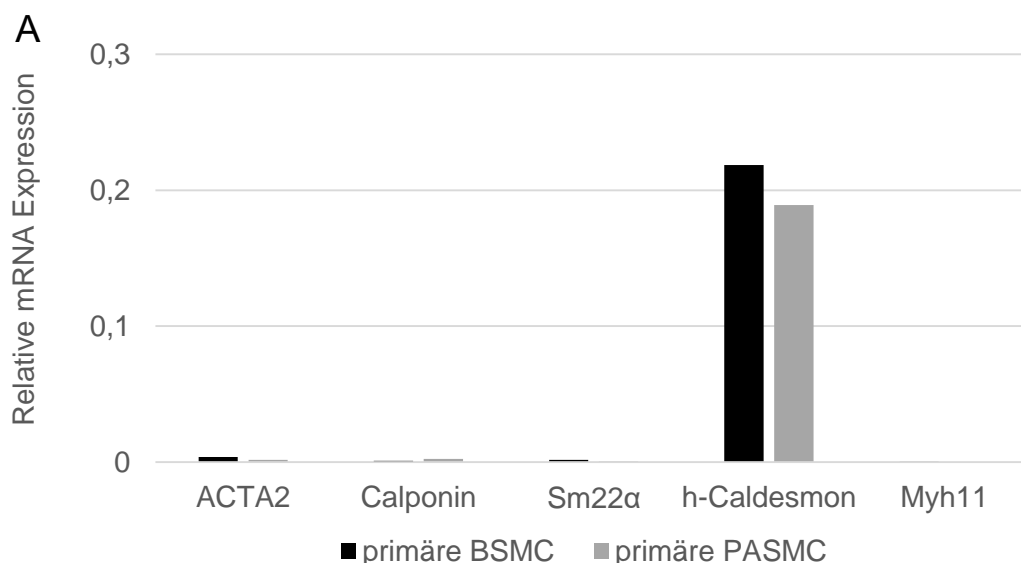
| reduzierte Genkombinationen | Anzahl infizierter Wells |
|-----------------------------|--------------------------|
| E7, Bmi1, Nanog | 26x (ASMC (COPD)) |
| | 4x (AoSMC) |
| | 15x (PASMC) |
| E6, E7, ID2 | 7x (ASMC (COPD)) |
| E7, Bmi1, Nanog, ID2 | 5x (AoSMC) |
| E6, E7, Nanog, ID2 | 3x (ASMC (COPD)) |
| E7, Bmi1, Nanog, E6, ID2 | 13x (ASMC (COPD)) |
| | 6x (PASMC) |

3.3 Charakterisierung der Glattmuskelzelllinien

Im Körper übernehmen Glattmuskelzellen eine Vielzahl von Aufgaben (Beamish et al., 2010). Um diese Vielzahl an Aufgaben abdecken zu können, lässt sich der Glattmuskelphänotyp in kontrahierend und nicht teilend sowie in synthetisch und proliferativ einteilen (Beamish et al. 2010; Rensen, Doevendans und Van Eys 2007; Scirocco et al. 2016). Spezifische Glattmuskelmarker für einen ausdifferenzierten kontraktilen Phänotyp sind α -smooth muscle Actin (ACTA2), Calponin, Sm22 α (Transgelin), Myh11 (Smooth muscle myosin heavy chain) und h-Caldesmon (Beamish et al., 2010). Dagegen lässt sich der synthetische Phänotyp durch die verstärkte Expression der Marker Vimentin, Tropomyosin 4 und die *Nonmuscle Myosin heavy chain B* (Myh10) erkennen (Beamish et al., 2010). ACTA2, ein Marker des kontraktilen Phänotyps, gehört zur Familie der Aktine. Er ist bedeutend für die Strukturgebung und Beweglichkeit der Zellen und auch ein Hauptbestandteil des kontraktilen Apparates (Perrin und Ervasti 2010; Yuan 2015). Myh11 gehört zur Gruppe der Myosine und ist ebenfalls ein Hauptbestandteil des kontraktilen Apparates. Durch die Hydrolyse von ATP wandelt es chemische Energie in mechanische Energie um. Calponin ist ein Calcium-bindendes Protein, das die ATPase-Aktivität des Myosins inhibiert (Liu und Jin 2017). Calponin reguliert somit Aktin-Myosin-Interaktionen und damit die Kontraktion. Bei Sm22 α handelt es sich um ein Aktin-bindendes Protein, das zur Familie der Calponine gehört (Solway et al., 1995). Es ist ein früher Marker der Glattmuskelzelldifferenzierung. Der Marker h-Caldesmon ist ein Calmodulin-, Aktin- und Myosin-bindendes Protein, das die Aktinpolymerisation verhindert. Es inhibiert außerdem die Myosin-ATPase-Aktivität und ist somit an der Regulation der Kontraktion beteiligt (Kim et al. 2008).

3.3.1 Analyse zelltypspezifischer Marker auf RNA und Protein Ebene

Nach der erfolgreichen Immortalisierung wurde der Fokus auf die Charakterisierung der generierten BSMC, PASMCM und ASMC (COPD) Linien gelegt. Zunächst wurde hierfür die spezifische Markerexpression der BSMC und PASMCM Linien im Vergleich zu den primären Zellen untersucht (Abbildung 13). Abbildung 13 A zeigt die Expression spezifischer Glattmuskelgene in primären PASMCM (p5) und BSMC (p5). Bei Betrachtung fällt auf, dass die Expressionen der Marker ACTA2, Calponin, Myh11 und Sm22 α relativ gesehen zur Expression der Referenzgene sehr gering, im Bereich von 10^{-3} - 10^{-4} , war. Lediglich der Marker h-Caldesmon war stärker exprimiert. Dies lässt den Schluss zu, dass primäre Glattmuskelnzellen in-vitro die Expression wichtiger Markergene bereits nach wenigen Passagen herunterregulieren. In der Abbildung 13 B ist die Expression der primären Zellen im Vergleich zu derer von zwei repräsentativen Linien dargestellt. Zellen der BSMC Linie exprimierten weniger ACTA2 und h-Caldesmon im Vergleich zur primären Kontrolle in p5, dafür aber viermal so viel Calponin und doppelt so viel Sm22 α . Vergleicht man die Genexpression primärer PASMCM mit der Expression der repräsentativen PASMCM Linie, so erkennt man eine verstärkte Expression wichtiger Marker (ACTA2, Calponin und SM22 α). Lediglich h-Caldesmon wurde schwächer exprimiert. Das bedeutet, dass die Linien eine vergleichbare beziehungsweise sogar stärkere (PASMCM) Expression glattmuskelspezifischer Gene zeigten als die primären Kontrollzellen. Gleichzeitig muss aber auch festgehalten werden, dass die Expression aller Markergene auffallend gering war. Um zu bestätigen, dass die Gene spezifisch für Glattmuskelnzellen sind, wurde eine Fibroblasten-Kontrollzelllinie auf die Expression der oben genannten Marker getestet. Dabei ist zu sehen, dass Fibroblasten weder ACTA2 noch Sm22 α exprimierten. Die Expression von Calponin und h-Caldesmon war marginal.



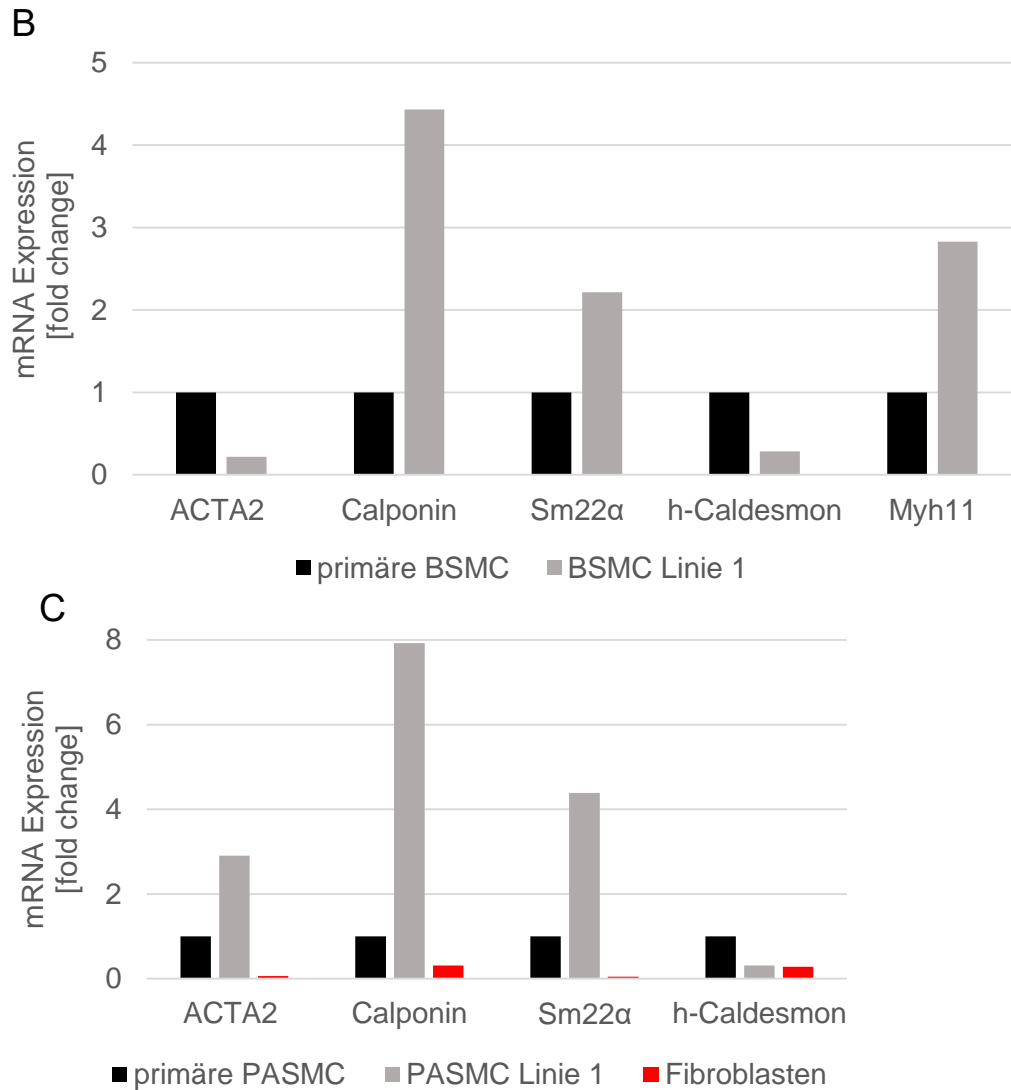


Abbildung 13: mRNA Expression von Glattmuskelzellmarkern. Um zu zeigen, dass die Linien nach der Immortalisierung ihren Glattmuskelphänotyp behalten, wurden sie zunächst auf die Expression spezifischer Glattmuskelzellmarker hin untersucht. A) Expression glattmuskelspezifischer Gene in pBSMC und pPASC. Normalisiert wurde gegen die Expressionen der Referenzgene GAPDH und β 2M. B) Dargestellt sind exemplarisch die Expressionen einer BSMC Linie (p17) und einer PASC Linie (p28), beide im Vergleich zu ihren primären Kontrollen (pBSMC p5, pPASC p5). Die Expressionen wurden gegen die der Referenzgene GAPDH und β 2M normalisiert und die „fold“-Expressionen durch Einbeziehung der Expressionen der primären Kontrollen berechnet. Um die Spezifität der Glattmuskelzellgene zu untersuchen, wurde eine Fibroblasten-Kontrollzelllinie mitgetestet, die im Vergleich zu den primären PASC kaum Markerexpressionen zeigte. n=1.

Anschließend wurde die Expression der Marker ACTA2 und Calponin per Immunzytochemie untersucht, um zu überprüfen, ob trotz der schwachen Genexpression funktionale Proteine nachzuweisen sind. Die Untersuchungen zeigten, dass nur sehr wenige Zellen, positiv für ACTA2 waren (Abbildung 14). Dies war unabhängig vom Isolationsort der primären Zellen. Weder Zellen der BSMC Linien noch die der PASC oder ASMC (COPD) Linien zeigten

starke Signale. Abgebildet sind die Daten dreier repräsentativer Glattmuskellinien. Die ACTA2-Signale waren im Zytoplasma lokalisiert und bei genauer Betrachtung lassen sich auch die einzelnen Aktinfilamente erkennen, die sich durch das Zytoplasma zogen. Abbildung 14 zeigt auch die ACTA2-Färbungen der primären BSMC und PSMC. Wie zu erkennen ist, waren die primären BSMC negativ für ACTA2. Die primären PSMC wuchsen generell schlechter in Kultur, wodurch weniger Zellen auf der Probe zu erkennen waren als bei den primären BSMC, jedoch zeigten die Färbungen ACTA2-positive PSMC. Die Ergebnisse der Calponin-Färbungen sind in Abbildung 15 dargestellt. Hier konnten deutlich mehr positive Zellen detektiert werden. Calponin sollte im Zytoplasma in der Nähe der Aktinfilamente lokalisiert sein. Die Lokalisation im Zytoplasma ist in Abbildung 15 deutlich zu erkennen. Die Färbungen der BSMC Linie zeigten, dass ungefähr 70 % der Zellen Calponin-positiv waren. Ebenfalls waren fast alle Zellen der ASMC (COPD) Linie schwach positiv für Calponin. Auch bei den immortalen PSMC konnten neben vielen negativen Zellen Calponin-positive Zellen detektiert werden. Die primären Zellen zeigten spezifische Signale. Während bei den primären BSMC nur vereinzelte Calponin-positive Zellen detektiert werden konnten, waren ungefähr 60 % der primären PSMC positiv für den Marker Calponin. Durch sekundäre Kontrollfärbungen, die bei gleicher Belichtungszeit kein Signal zeigten, wurde das unspezifische Binden der Antikörper ausgeschlossen (Abbildungen 14 und 15). Zusätzlich wurde die Muskelspezifität von ACTA2 und Calponin untersucht, indem Fibroblasten sowie HuVEC angefärbt wurden. Weder für ACTA2 noch für Calponin wurden positive HuVEC oder Fibroblastenzellen detektiert. Die Daten der Fluoreszenzfärbungen zeigen, dass sich die Linien und die primären Zellen in der Synthese von Calponin und ACTA2 sehr ähneln. Bezüglich der BSMC waren sogar deutlich mehr immortale Zellen Calponin-positiv als primäre Zellen.

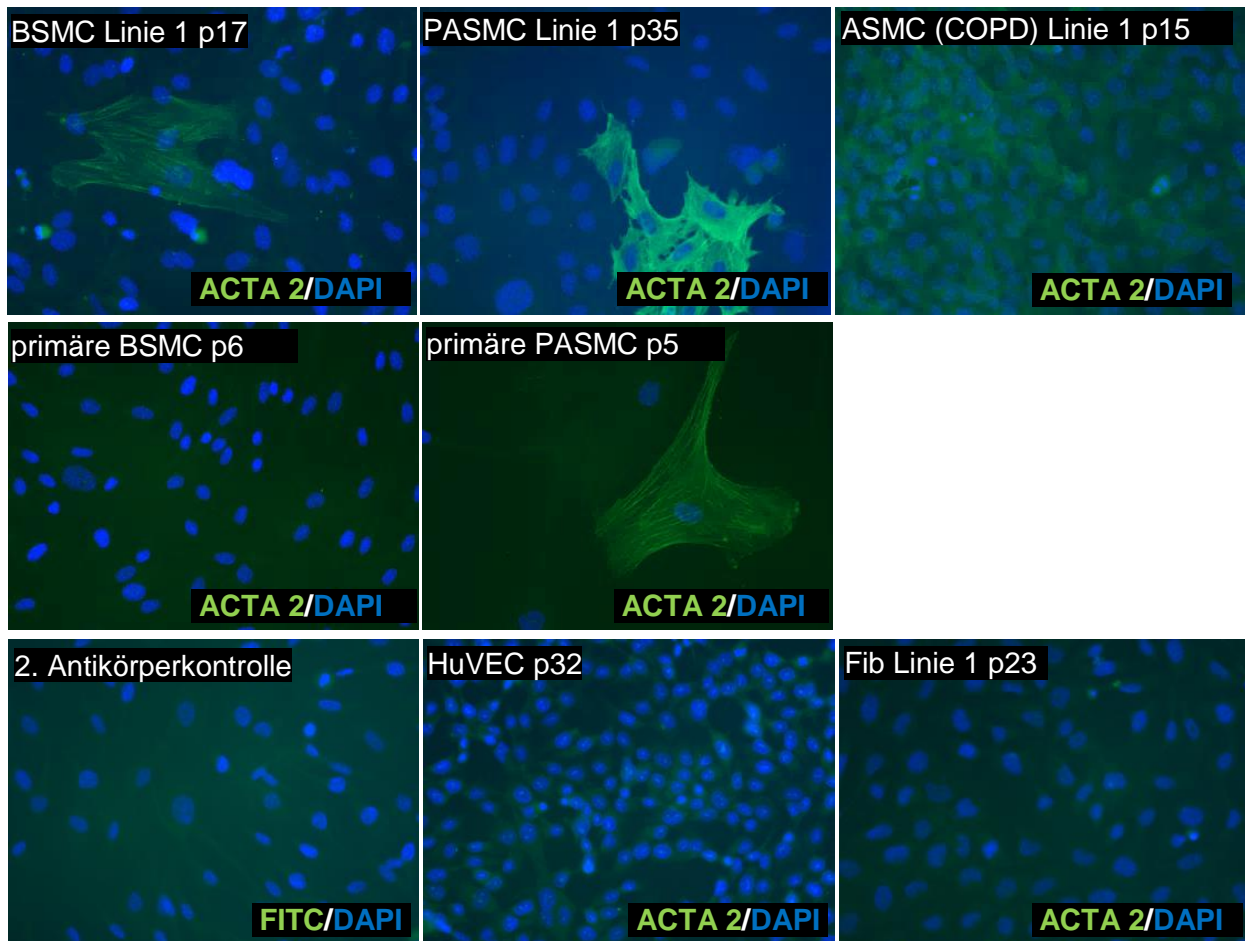


Abbildung 14: Immunzytochemie des Glattmuskellmarkers ACTA2. Repräsentative Vertreter der generierten Glattmuskellinien, primäre PSMC und BSMC sowie Kontrollzellen (HuVEC und Fibroblasten) wurden auf Glasplättchen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 85-100 % kultiviert. Dann wurden sie mit 100 % Methanol für 10 min bei RT fixiert. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 0,5 % Triton permeabilisiert und anschließend mit dem primären Anti-ACTA2-Antikörper für 2h bei RT inkubiert. Der ersten Antikörperinkubation folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 1h bei RT. Abschließend wurden die Zellen im Einbettungsmedium, das DAPI enthielt, über Nacht bei RT eingebettet und danach fluoreszenzmikroskopisch bei 400-facher Vergrößerung analysiert. Fib=Fibroblasten, n=2.

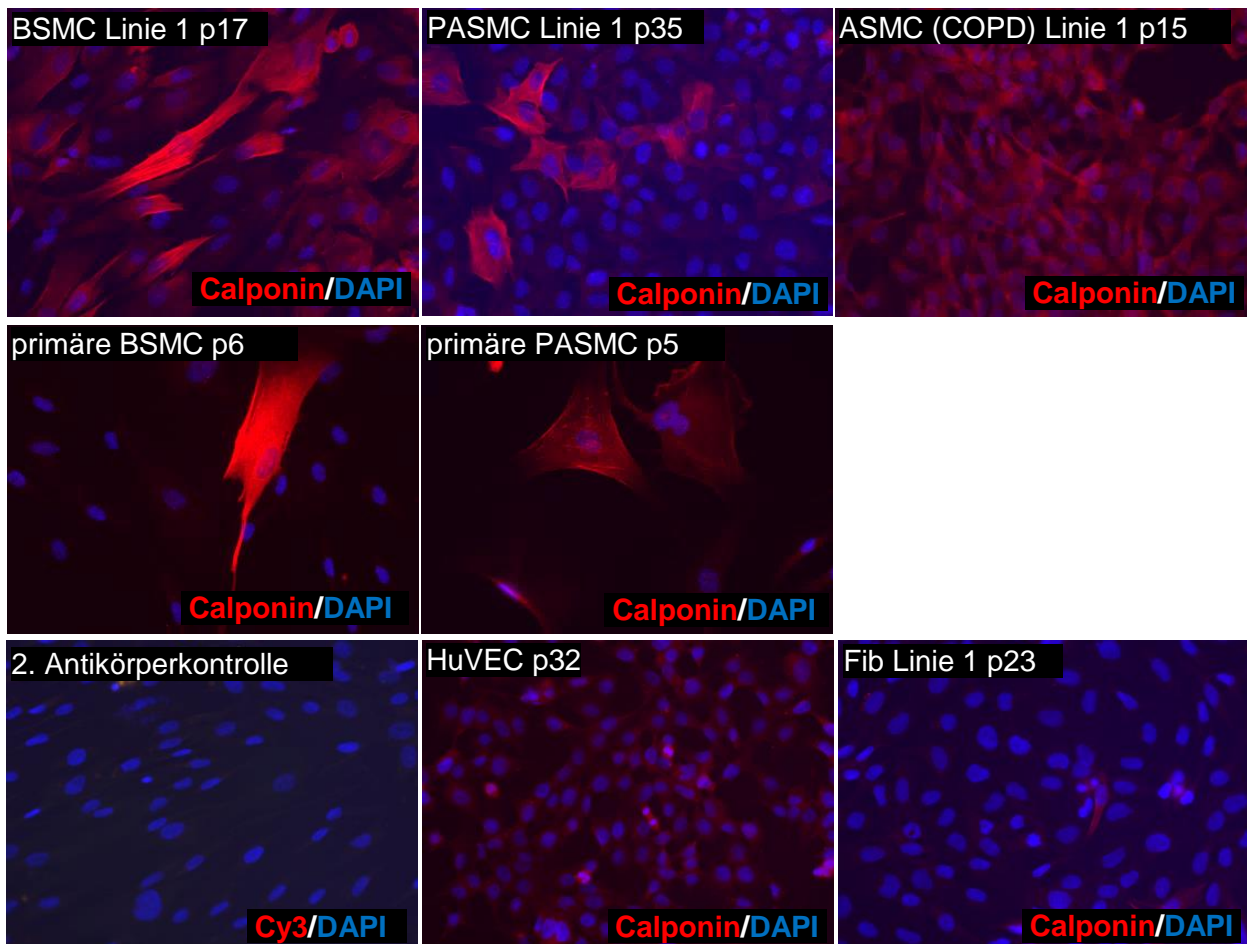


Abbildung 15: Immunzytochemie des Glattmuskemarkers Calponin. Repräsentative Vertreter der generierten Glattmuskellinien, primäre PASMC und BSMC sowie Kontrollzellen (HuVEC und Fibroblasten) wurden auf Glasplättchen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 85-100 % kultiviert. Dann wurden sie mit 4 % PFA für 10 min bei RT fixiert. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 0,5 % Triton permeabilisiert und anschließend mit dem primären Anti-Calponin-Antikörper für 2 h bei RT inkubiert. Der ersten Antikörperinkubation folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, ebenfalls für 1h bei RT. Abschließend wurden die Zellen im Einbettungsmedium, das DAPI enthielt, über Nacht bei RT eingebettet und danach fluoreszenzmikroskopisch bei 400-facher Vergrößerung analysiert. Fib=Fibroblasten, n=2.

3.3.2 Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf die Markerexpression

Wie aus den Abbildungen 14 und 15 hervorgeht, war die Expression der Glattmuskemarkers ACTA2 und Calponin in den Linien gering. Daher wurde versucht die Differenzierung in den etablierten Linien durch eine Modifikation in den Kultivierungsbedingungen zu induzieren. Für die Untersuchung wurde eine BSMC Linie verwendet. Zuerst wurde die Kultivierung der Glattmuskelzellen ohne Serum, wie erfolgreich in Han et al. beschrieben, getestet (Han, Wen, Zheng, Cheng, & Zhang, 2006). Nach 48 h im serumfreien Medium wurde hier mittels qRT-PCR eine erhöhte Expression der Marker ACTA2, Sm22- α und Calponin in vaskulären SMC detektiert (Han et al., 2006). Für die serumfreie Kultur wurden die Zellen zunächst zur

besseren Anheftung und Anpassung in Ham's F12/DMEM Medium mit 1 % FBS ausgesät. Zwei Tage später wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das serumfreie Medium (Ham's F12/DMEM (1:1)) zu den Zellen gegeben und diese darin kultiviert. Wie in Abbildung 16 A zu erkennen ist, war die serumfreie Kultivierung der BSMC für einen Zeitraum von 12 Tagen möglich. Allerdings lässt sich beobachten, dass von Tag 5 auf Tag 12 Zellen abstarben und kein konfluenter Zellrasen mehr zu erkennen war. Antikörperfärbungen gegen ACTA2 und Calponin wurden nach einem Serumentzug von zwei Tagen durchgeführt. Diese zeigten jedoch keine stärkere Markerexpression (Abbildung 16 B).

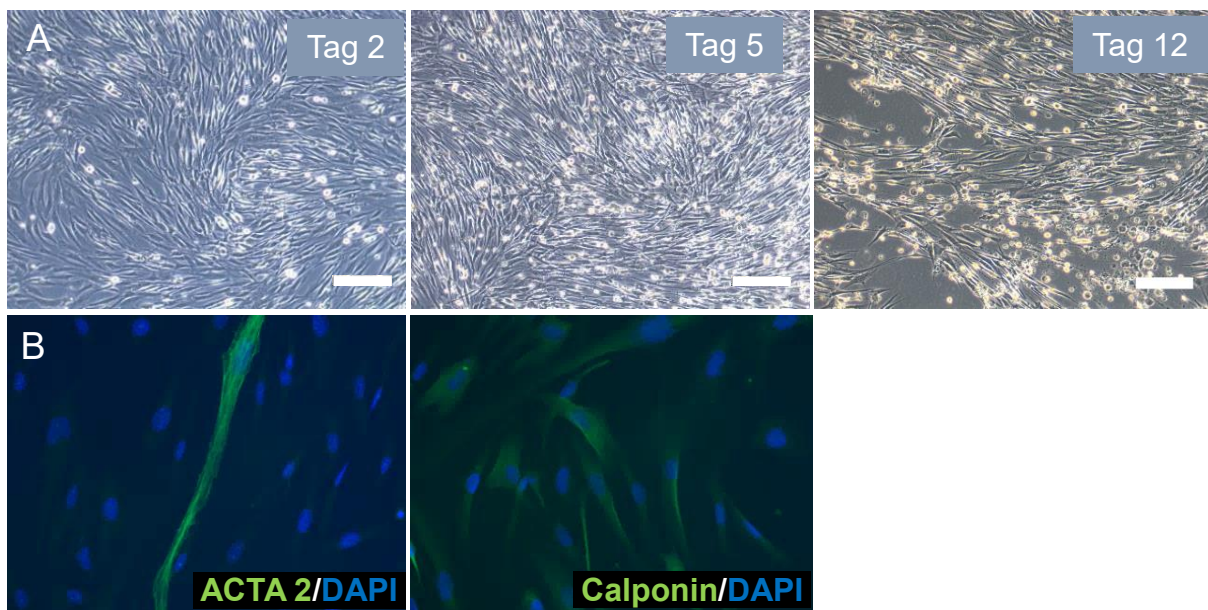


Abbildung 16: Serumfreie Kultivierung einer Glattmuskelzelllinie zur Steigerung des Glattmuskelphänotyps. A) Zellen der BSMC Linie 1 wurden für bis zu 12 Tage ohne Serum (nur in HAM F12/DMEM (1:1) Medium) kultiviert. Zur Anpassung wurden ihnen bereits zwei Tage zuvor die Zusätze entzogen und nur in Ham's F12/DMEM und 1 % FBS kultiviert. An den Tagen 2, 5 und 12 wurden mikroskopische Aufnahmen zur Bestimmung der Morphologie gemacht. Messbalken 200 μ m. B) Immunfärbung auf ACTA2 und Calponin. Dafür wurden die Zellen auf Deckgläschen mit 1 % FBS ausgesät. Nach dem Anheften wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen und die Zellen für zwei Tage im serumfreien Medium weiterkultiviert. Anschließend wurden sie fixiert, permeabilisiert und mit den jeweiligen primären Antikörpern für 2h bei RT inkubiert. Nach dem dreimaligen Waschen mit PBS erfolgte die Färbung mit dem sekundären Antikörper für 1 h bei RT. Zuletzt wurden die Zellen in Einbettungsmedium mit DAPI eingebettet. Die Analyse erfolgte am Fluoreszenzmikroskop bei 400-facher Vergrößerung. n=1.

Ein anderer Versuch den Glattmuskelzellphänotyp in den Linien zu steigern, ist die Kultivierung der Zellen in 3D. In 3D können sich die Zellen untereinander stärker vernetzen und miteinander kommunizieren. Außerdem erfolgt keine Anheftung der Zellen an eine unphysiologische Plastikmatrix (Knight und Przyborski 2015). Für die 3D-Kultivierung wurde das Adhären der Zellen an den Plattenboden durch eine Agarosebeschichtung verhindert,

die Zellen lagerten sich dadurch in Aggregaten, auch Sphäroide genannt, zusammen (Abbildung 17). Abbildung 17 A zeigt, dass Zellen der BSMC Linie 1 stabile Sphäroide bildeten. Diese wurden nach einer Woche auf die Proteine ACTA2 und Calponin gefärbt. Die Zellaggregate zeigten keine Expression von Calponin. Außerdem konnten nur schwache Signale für ACTA2 detektiert werden.

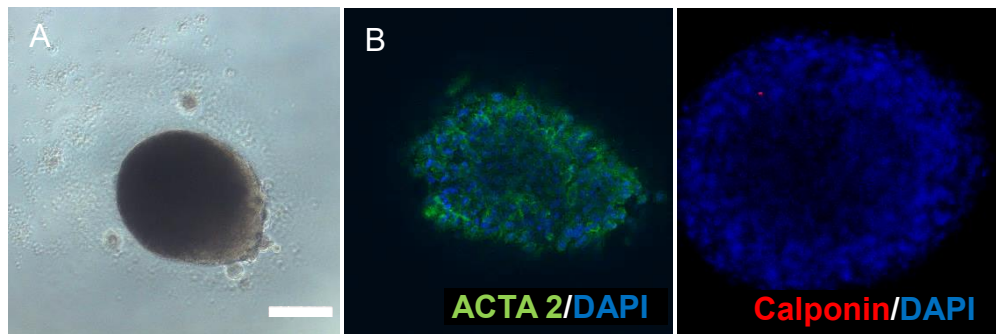


Abbildung 17: 3D-Kultivierung einer Glattmuskellinie zur Steigerung des Glattmuskelfhnotyps. A) Zellen der BSMC Linie 1 wurden in mit 0,2 % Agarose-beschichtete Wells einer 96-Well Platte ausgesät (20000 Zellen/Well) und kultiviert. Die Zellen aggregierten zu Sphäroiden und wurden nach einer Woche am Durchlichtmikroskop analysiert. Messbalken 200 μ m. B) Nach einer Woche in Kultur wurden die Sphäroide gegen die Marker ACTA2 und Calponin fluoreszenzgefärbt. Dafür wurden sie zunächst fixiert, anschließend für 30 min permeabilisiert und mit den primären Antikörpern über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag folgte die sekundäre Antikörperfärbung für 1,5 h. Abschließend wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt und die Sphäroide am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. n=1.

Ein dritter Ansatz, der getestet wurde um die Differenzierung zu induzieren, ist ein Stimulierungsmedium mit den Zusätzen TGF- β 1 (Transformierender Wachstumsfaktor β 1) und B27. Diese Zusätze werden für die Differenzierung von hiPSC zu reifen Glattmuskelzellen in Yang et al. beschrieben (Yang et al. 2016). TGF- β 1 ist ein Zytokin, das unter anderem die Zellproliferation und Differenzierung in verschiedenen Zellen beeinflusst (Bai & Xi, 2018; Pan et al., 2018). B27 findet oft Verwendung bei der Kultivierung neuronaler Zellen beziehungsweise bei der Differenzierung von Stammzellen in Neuronen (Chen et al. 2008; D'Aiuto et al. 2014; Faghih et al. 2019). Durch eine definierte sowie komplexe Zusammensetzung eignet es sich für die serumfreie oder serumreduzierte Kultivierung (Faghih et al., 2019; Shen et al., 2019). B27 besteht aus 20 Zusätzen darunter Vitamine wie Biotin; Proteine wie Catalase, Transferrin und weitere Stoffe wie D-Galaktose, Linolsäure oder Progesteron (Brewer et al., 1993). Für die Stimulierung wurden Zellen einer bronchialen Glattmuskelzelllinie ausgesät und im Stimulierungsmedium (Ham's F12/DMEM +1 % FBS + 5 ng/ml TGF- β 1 + 0,7 % B27) kultiviert. Nach drei Tagen im Stimulierungsmedium lagerten sich die Glattmuskelzellen in Grüppchen an (Abbildung 18 A). Eine anschließende Fluoreszenzfärbung auf ACTA2 und Calponin zeigte eine starke Erhöhung der

Markerexpression (Abbildung 18 B). 100 % der Zellen waren positiv für ACTA2 sowie auch für Calponin. Die Zellen lagerten sich außerdem zu einem dichten Verband zusammen, wie es für Glattmuskelzellen typisch ist (Abbildung 18 B).

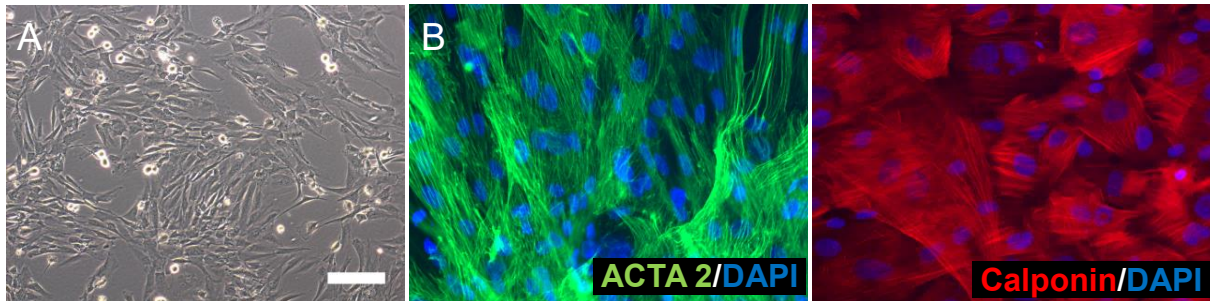


Abbildung 18: Expressionssteigerung von ACTA2 und Calponin im Stimulierungsmedium. A) Die Zellen der BSMC Linie 1 wurden in der 6-Well Platte ausgesät und für drei Tage im Stimulierungsmedium kultiviert. Das Stimulierungsmedium setzte sich aus Ham's F12/DMEM mit 1 % FBS, 5 ng/ml TGF- β 1 und 0,7 % B27 zusammen. Nach drei Tagen wurden die Zellen am Durchlichtmikroskop untersucht. Messbalken 200 μ m. B) Für die Immunfärbungen wurden die Zellen auf Deckgläschen ausgesät und für drei Tage mit dem Stimulierungsmedium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen entweder mit 100 % Methanol (ACTA2-Färbung) oder 4 % PFA (Calponin-Färbung) fixiert und immunzytochemisch gefärbt. Die Analyse erfolgte am Fluoreszenzmikroskop bei 400-facher Vergrößerung. Repräsentative Abbildungen, n=3.

Zusätzlich wurde die Stimulierbarkeit der Zellen über der Zeit analysiert. Dafür wurden die Zellen im Stimulierungsmedium für 2, 3 und 14 Tage kultiviert und anschließend auf die Expression von ACTA2 hin analysiert (Abbildung 19). Dabei lässt sich erkennen, dass bereits innerhalb von zwei Tagen die Expression von ACTA2 induziert wurde und ungefähr 40 % der Zellen ACTA2-positiv waren. Wie bereits erwähnt, steigerte sich dieses Signal nach drei Tagen auf 100 %. Auch nach 14 Tagen waren viele Zellen positiv für ACTA2, jedoch konnte eine Abnahme des Signals im Vergleich zu Tag 3 beobachtet werden. Des Weiteren ließ sich an Tag 14 eine starke Ansammlung von Zellgruppen und damit kein zusammenhängender Zellverband mehr erkennen.

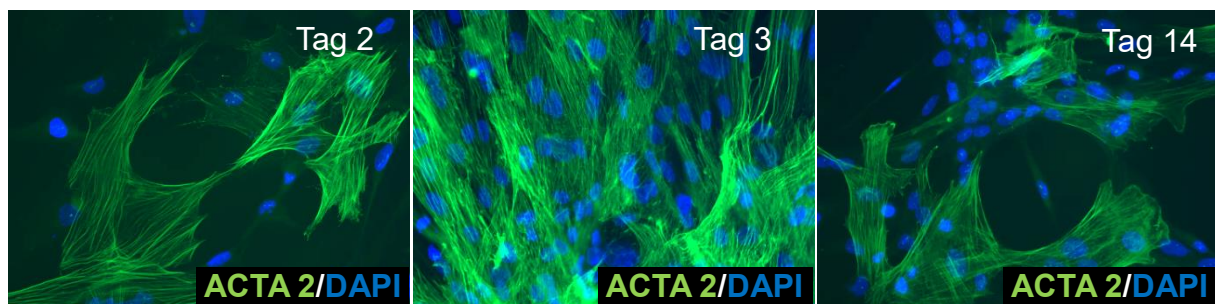


Abbildung 19: Stimulierung einer BSMC Linie über der Zeit. BSMC der Linie 1 wurden auf Deckgläschen ausgesät und im Stimulierungsmedium kultiviert. Nach verschiedenen Zeitpunkten im Stimulierungsmedium wurden die Zellen fixiert und gegen den Marker ACTA2 immungefärbt. Die Analyse der Zellen wurde am Fluoreszenzmikroskop bei 400-facher Vergrößerung durchgeführt. n=1-3.

Um den Einfluss des Medium auf die Vitalität der Zellen zu untersuchen und mögliche Rückschlüsse auf die Proliferation der Zellen zu ziehen, wurde ein WST-8 Assay durchgeführt. Hierbei wird das Tetrazoliumsalz WST-8 in ein wasserlösliches, orangefarbenes Formazan reduziert (Tsukatani et al., 2008). Die Reduktion wird durch vitale, metabolisch aktive Zellen umgesetzt und kann als Absorptionsänderung im Überstand spektrophotometrisch gemessen werden. Somit gibt der Assay Aufschluss über die metabolische Aktivität der Zellen. Um Rückschlüsse auf die Zellzahl ziehen zu können, wurde eine Standardkurve angefertigt. Dafür wurden verschiedene Zellzahlen (0, 100, 500, 1000, 5000, 10000, 20000 Zellen) im 96-Well ausgesät und die metabolische Aktivität dieser über den WST-Assay bestimmt. Mit Hilfe der Standardkurve kann die Zellzahl nach Stimulation ermittelt werden, wenn davon ausgegangen wird, dass die metabolische Aktivität pro Zelle gleich bleibt. Zur Ermittlung der Proliferation wurden jeweils 5000 Zellen in verschiedenen Medien ausgesät und über einen Zeitraum von vier Tagen kultiviert (Abbildung 20). Die Daten aus Abbildung 20 zeigen, dass die Zellen im normalen Glattmuskelmedium mit einem FBS-Gehalt von 5 % am stärksten proliferierten. Hier hat sich die Zellzahl über den Kultivierungszeitraum vervierfacht. Auch zu erkennen ist, dass die Proliferation im reinen Ham's F12/DMEM (1:1) Medium ohne FBS am geringsten war und die Zellen über den Zeitraum von 4 Tagen nicht proliferieren. Mit 1 % FBS im Medium war bereits eine Verdopplung der Zellzahl über die Zeit zu beobachten. Mit den Zusätzen TGF- β 1 und auch die Kombination von TGF- β 1 und B27 stieg die Zellzahl noch mal minimal an. Die Kultivierung der Zellen in 1 % FBS und B27 führte zu einer Verdreifachung der Zellzahl. Dies zeigt, dass B27 die Proliferation ankurbelte, während sich TGF- β 1 im Stimulierungsmedium als proliferationshemmend herausstellte.

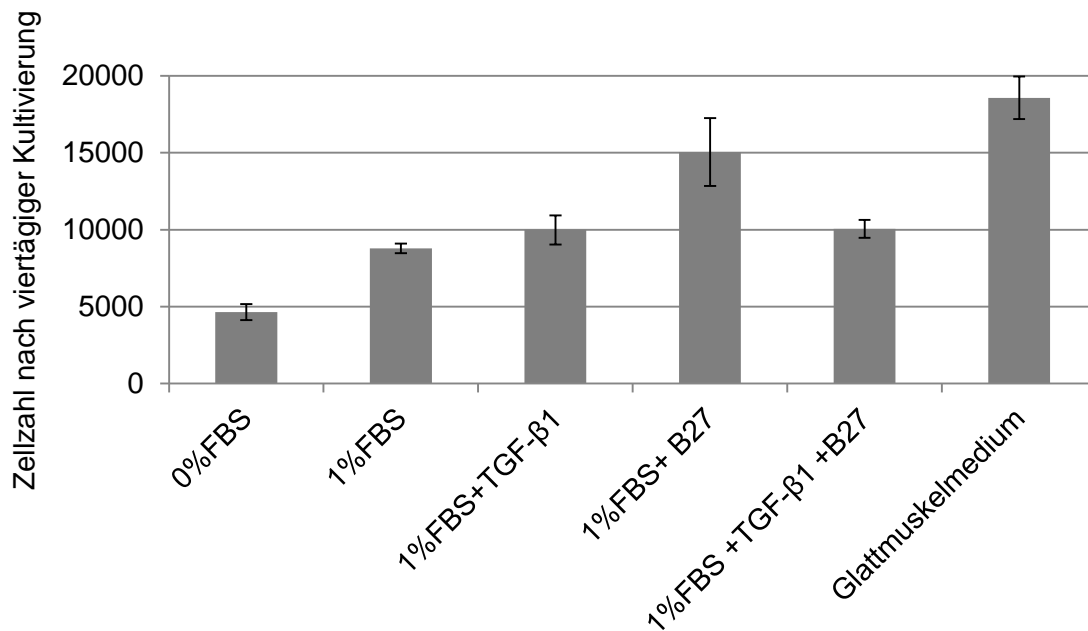


Abbildung 20: Einfluss der Kultivierungsmedien auf die Zellproliferation. Zellen der BSMC Linie 1 wurden in Triplikaten in den verschiedenen, angezeigten Medien über eine Zeitdauer von vier Tagen kultiviert. Anschließend wurde mittels des WST-8 Assay die metabolische Aktivität der Zellen spektrophotometrisch bei 450 nm bestimmt. Um Rückschlüsse auf die Proliferation zu ziehen, wurde vorab eine Standardreihe aufgenommen, bei der die metabolische Aktivität verschiedener Zellzahlen (0, 100, 500, 1000, 5000, 10000, 20000 Zellen) mit Hilfe des WST-8 Assay ermittelt wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung.

In Abbildung 21 wurde das Stimulierungsmedium in Kombination mit der 3D-Kultivierung getestet, um zu sehen, ob auch in 3D die Induktion der Differenzierung beobachtet werden kann. Dabei ließ sich zunächst erkennen, dass die Formen der Sphäroide nach einer Woche vergleichbar mit denen im normalen Kultivierungsmedium waren. Zusätzlich zeigten die Färbungen der Sphäroide auch in 3D eine deutliche Signalsteigerung für ACTA2 und Calponin nach Stimulierung.

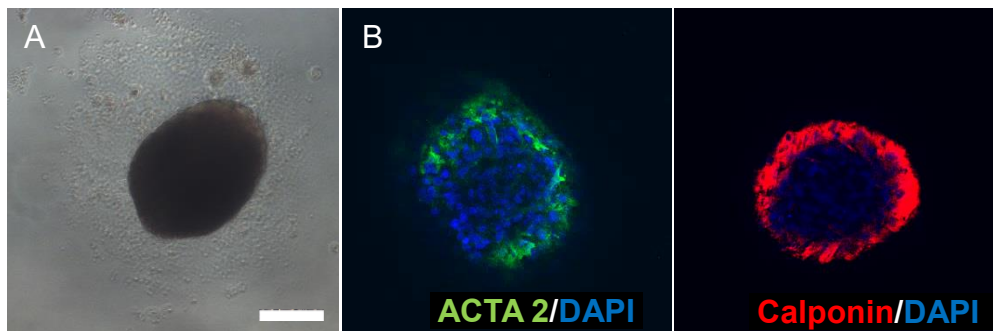


Abbildung 21: Stimulierung einer Glattmuskelzelllinie in 3D. A) Um die 3D-Aggregate zu formen, wurden Zellen der BSMC Linie 1 in mit 0,2 % Agarose-beschichtete Wells einer 96-Well Platte ausgesät (20000 Zellen/Well) und für eine Woche kultiviert. Anschließend wurden sie am Durchlichtmikroskop analysiert. Messbalken 200 µm. B) Für die Immunfärbungen wurden die Sphäroide zunächst fixiert, dann für 30 min permeabilisiert und mit den primären Antikörpern über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag folgte die sekundäre Antikörperfärbung für 1,5 h. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt und die Sphäroide am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. n=1.

Zusätzlich wurde der Einsatz der Medienzusätze TGF- β 1 und B27 an weiteren Glattmuskelzelllinien getestet um festzustellen, ob sie sich generell zur Stimulierung von Glattmuskelzellen eignen. Eine bronchiale Glattmuskelzelllinie (BSMC Linie 4) sowie zwei Glattmuskelzelllinien der Pulmonalarterie (PASMC Linie 5 und 6) wurden aufgrund ihres zu schnellen oder zu langsamen Wachstums und der Vielzahl an Linien nicht weiter charakterisiert. Bei der Stimulierung der restlichen Linien wurde mit Hilfe des Stimulierungsmediums die Expression der Marker ACTA2 und Calponin in acht von neun getesteten Glattmuskelzelllinien deutlich gesteigert (Abbildung 22 und 23). Auch konnten nach Stimulierung Unterschiede in der Expression von ACTA2 und Calponin zwischen den Glattmuskelzelllinien beobachtet werden. So ist in den Abbildungen 22 und 23 zu erkennen, dass es eine Glattmuskelzelllinie gibt (PASMC Linie 4), die nach Stimulierung weder ACTA2 noch Calponin exprimiert. Abbildung 22 zeigt weiterhin, dass die Expression von ACTA2 in den BSMC Linien 2 und 3 induziert wurde, jedoch waren im Vergleich zur BSMC Linie 1 (Abbildung 18) nicht alle Zellen ACTA2-positiv. Auch bei den PASMC Linien 1-3 waren Unterschiede zu erkennen. So exprimiert die PASMC Linie 1 mehr ACTA2 als die Linien 2 und 3. Ungefähr 60-70 % der Zellen der PASMC Linie 1 waren ACTA2-positiv. Vergleicht man dazu die unstimulierten Zellen der PASMC Linie 1 aus Abbildung 12, so wird das Potential des Stimulierungsmediums deutlich. In Abbildung 14 waren nur circa 5 % der Zellen ACTA2-positiv. Betrachtet man die Anordnung des ACTA2 in den BSMC und stellt sie mit der Anordnung in den PASMC gegenüber, so lässt sich die spindelförmige Morphologie in den BSMC erkennen, die sich in den PASMC nach der Immortalisierung zur kuboidalen Morphologie gewandelt hat. Bei der Gegenüberstellung der beiden ASMC (COPD) Linien konnte man beobachten, dass ACTA2 deutlich schwächer exprimiert wurde als in den PASMC oder BSMC Linien. Außerdem zeigte die ASMC (COPD) Linie 1 mehr ACTA2-positive Zellen. In Abbildung 23 sind die Ergebnisse der Calponin-Färbungen zu sehen. Es lässt sich erkennen, dass nach der Stimulierung Zellen nahezu aller Linien positiv für Calponin waren. Neben der bereits erwähnten PASMC Linie 4, zeigte lediglich die BSMC Linie 3 eine geringere Signalintensität, aber auch hier waren viele Zellen Calponin-positiv. Aufgrund der Expressionsstärken und der Anzahl an ACTA2-positiven Zellen wurden neben der BSMC Linie 1 nur die orange-eingekästelten Linien (PASMC Linie 1 und ASMC (COPD) Linie 1) für die weiteren Analysen verwendet. Diese werden im Folgenden als BSMC, PASMC und ASMC (COPD) bezeichnet.

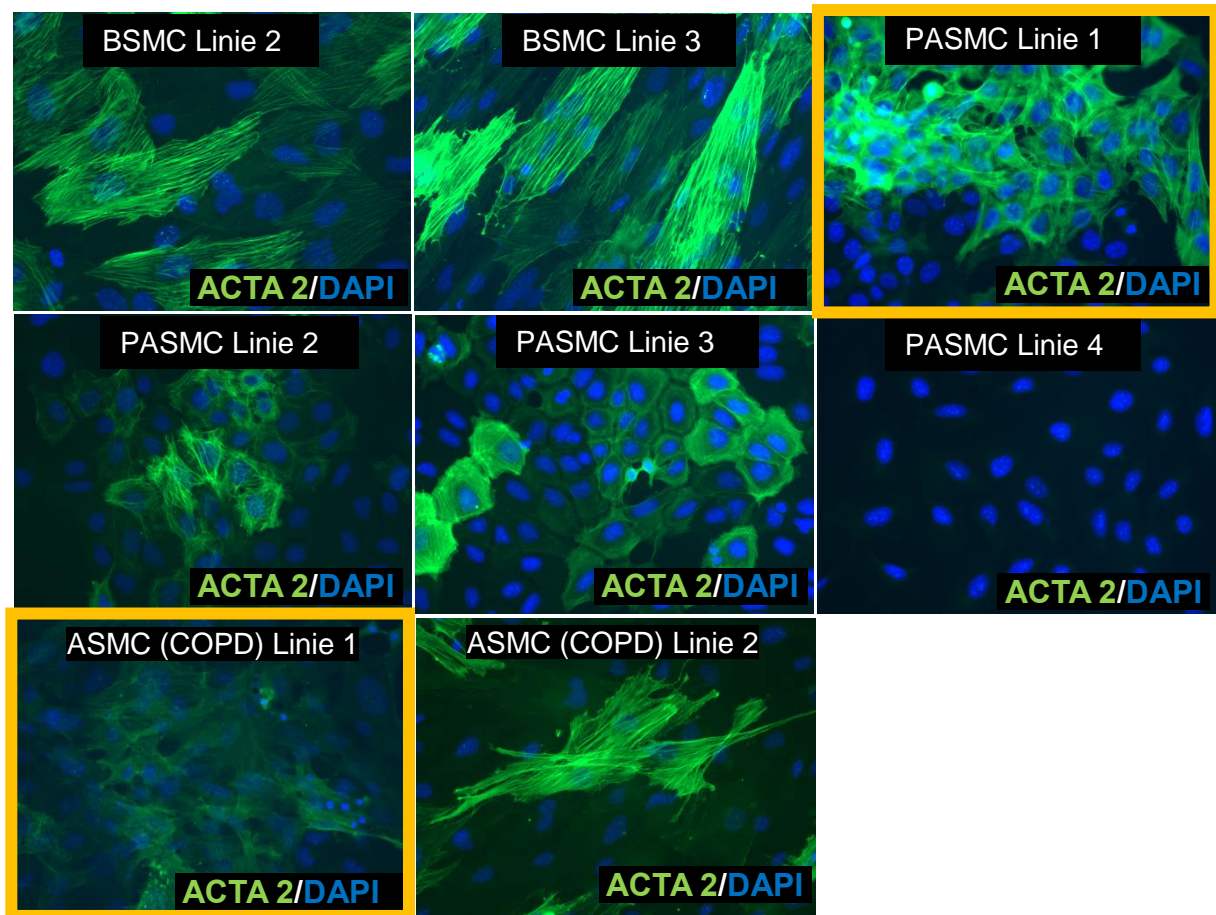


Abbildung 22: ACTA2-Färbung stimulierter Glattmuskellinien. Zellen der verschiedenen Linien wurden auf Deckgläschen ausgesät und für drei Tage im Stimulierungsmedium (Ham's F12/DMEM (1:1) mit 1 % FBS, 5 ng/ml TGF β -1 und 0,7 % B27) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit 100 % Methanol fixiert, permeabilisiert und immungefärbt. Die Analyse erfolgte am Fluoreszenzmikroskop bei 400-facher Vergrößerung. In orange sind die Linien eingekästelt, die für die weiteren Analysen verwendet werden. n=1.

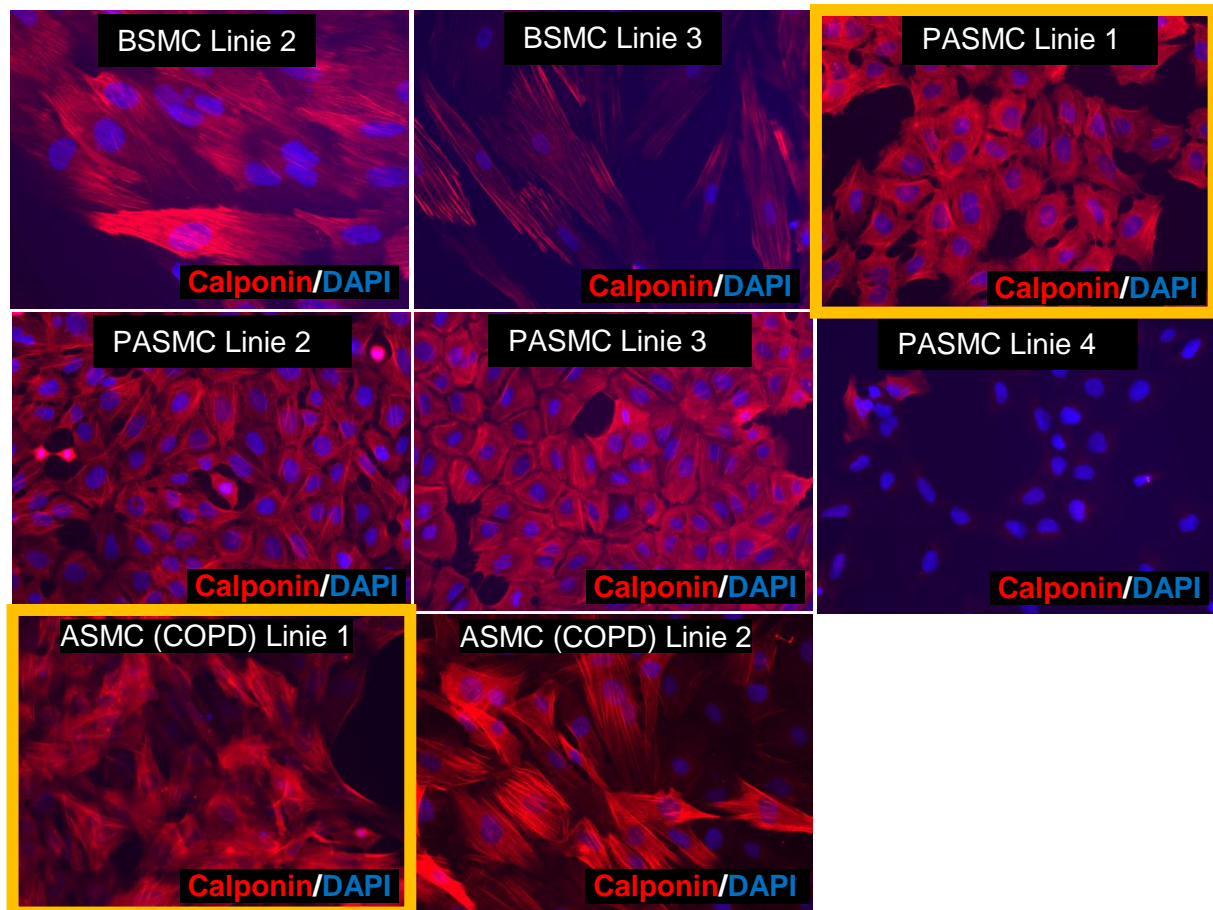


Abbildung 23: Calponin-Färbung stimulierter Glattmuskelzelllinien. Für die Färbung wurden die Zellen der verschiedenen Linien zunächst auf Deckgläschen ausgesät und für drei Tage im Stimulierungsmedium (Ham's F12/DMEM (1:1) mit 1 % FBS, 5 ng/ml TGF β -1 und 0,7 % B27) kultiviert. Dann wurden die Zellen mit 4 % PFA fixiert, permeabilisiert, immungefärbt und am Fluoreszenzmikroskop bei 400-facher Vergrößerung untersucht. Die orange-eingekästelten Linien werden für die weiteren Analysen verwendet. n=1.

Zusätzlich zu den Linien wurden auch die primären Kontrollzellen sowie eine Fibroblastenzelllinie mit TGF- β 1 und B27 stimuliert (Abbildung 24). Dabei ließ sich erkennen, dass von den primären Zellen ungefähr 5-10 % der Zellen ACTA2 und circa 50-80 % Calponin exprimieren. Interessanterweise wiesen die Fibroblastenzellen ebenfalls eine leichte Induktion der Glattmuskelzellmarker auf. Nach drei Tagen Kultivierung waren ungefähr 90 % der Zellen positiv für Calponin und circa 10-20 % der Zellen waren auch positiv für α -smooth muscle actin.

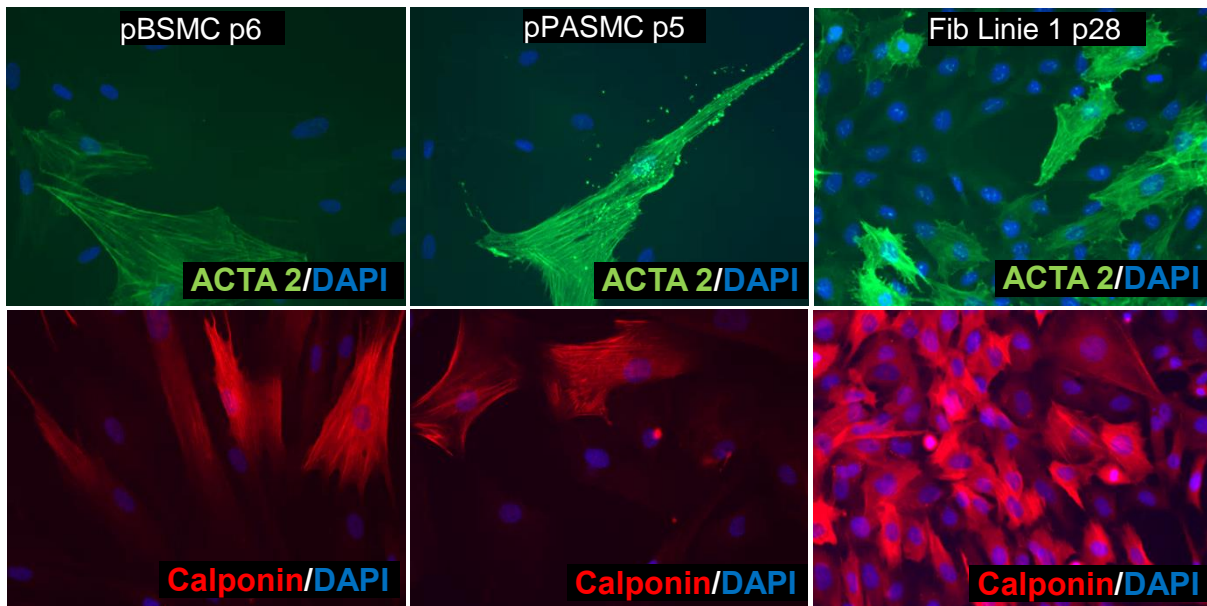


Abbildung 24: Stimulation der Kontrollzellen mit TGF- β 1 und B27. Primäre BSMC und PASC sowie Zellen einer Fibroblastenzelllinie wurden auf Deckgläschen ausgesät und für drei Tage im Stimulierungsmedium (Ham's F12/DMEM+ 5 % FBS + 5 ng/ml TGF- β 1 und 0,7 % B27) inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert und immunzytochemisch mit Antikörpern gegen ACTA2 und Calponin gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop bei 400-facher Vergrößerung analysiert. Fib=Fibroblasten, n=1.

Zur Quantifizierung der Proteinexpression wurde mittels qRT-PCR die spezifische Expression der Markergene nach Stimulation analysiert. Dafür wurden die Zellen drei Tage lang im Stimulierungsmedium inkubiert. Anschließend wurde die RNA isoliert und mittels qRT-PCR auf die Expression von ACTA2, Calponin, Sm22 α und h-Caldesmon untersucht. In Abbildung 25 sind zunächst die relativen Expressionen von ACTA2 im Bezug zu den Referenzgenen GAPDH und β 2M dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass primäre BSMC sowie immortale BSMC und PASC nach Stimulation verstärkt ACTA2 exprimieren. Bei den BSMC ist hierbei die stärkste Expressionssteigerung nach Stimulierung zu beobachten. Dagegen zeigten PASC die stärkste Genexpression. In Abbildung 26 wurde der fold change ermittelt. Abbildung 26 A zeigt die Expression der relevanten Marker vor und nach Stimulation in primären BSMC. Dabei ist zu erkennen, dass sich neben der ACTA2 Expression auch die Expressionen von h-Caldesmon und Calponin nach der Stimulation verdoppelt haben. Neben der Genexpression der primären Zellen wurde auch die Expression der BSMC und PASC vor und nach Stimulierung untersucht (Abbildung 26 B). Dabei ließen sich die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen quantifizieren. Die Gene ACTA2 und Calponin wurden in den PASC zwei- bis dreifach so stark exprimiert wie ohne Stimulierung. Auch die Genexpressionen von SM22 α und h-Caldesmon zeigten ungefähr eine Verdopplung in der Expressionshöhe. Durch die Differenzierung wurde in den

immortalisierten BSMCs eine starke Expressionssteigerung der Glattmuskelzellmarker detektiert. So steigerte sich die Expression von ACTA2 um das 139-fache, die des Calponins um das 15-fache, die von SM22 α um das 12-fache und die des h-Caldesmon um das 8-fache. Die Daten zeigen, dass durch die dreitägige Verwendung des Stimulierungsmediums die Genexpressionen sowie die Expression der Proteine in primären sowie in den immortalisierten Zellen stark gesteigert wurde.

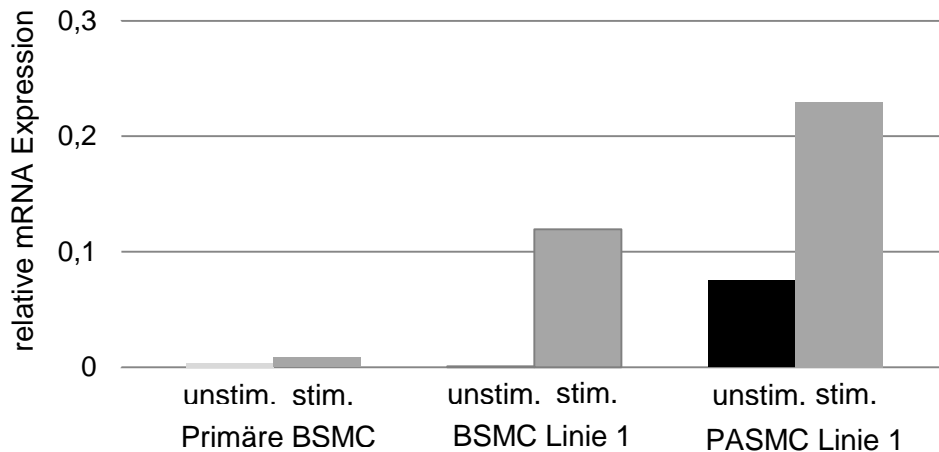
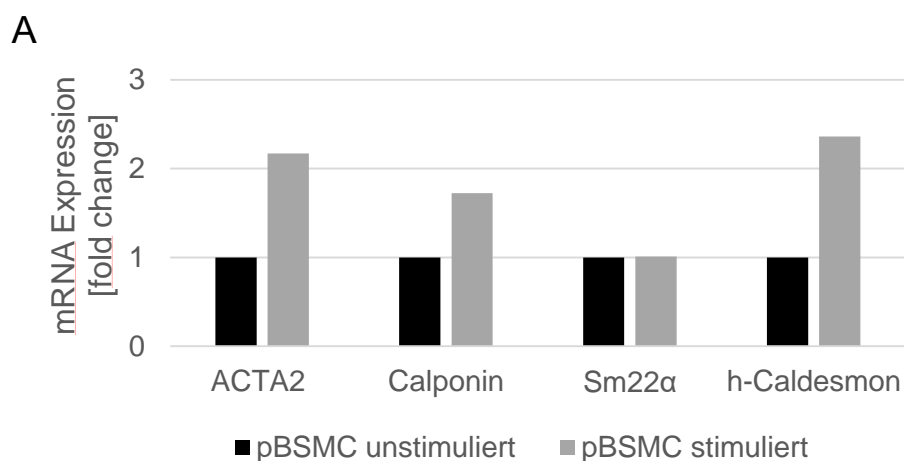


Abbildung 25: Relative ACTA2 mRNA Expression vor und nach Stimulation. Für die Analyse wurden die Zellen für drei Tage im Stimulierungsmedium (Ham's F12/DMEM (1:1) mit 1 % FBS, 5 ng/ml TGF β 1 und 0,7 % B27) kultiviert. Anschließend wurde die RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und für die q-PCR Analyse verwendet. Normalisiert wurde gegen die Expressionen der Referenzgene GAPDH und β 2M. stim.= stimuliert, unstim.= unstimuliert. n=1.



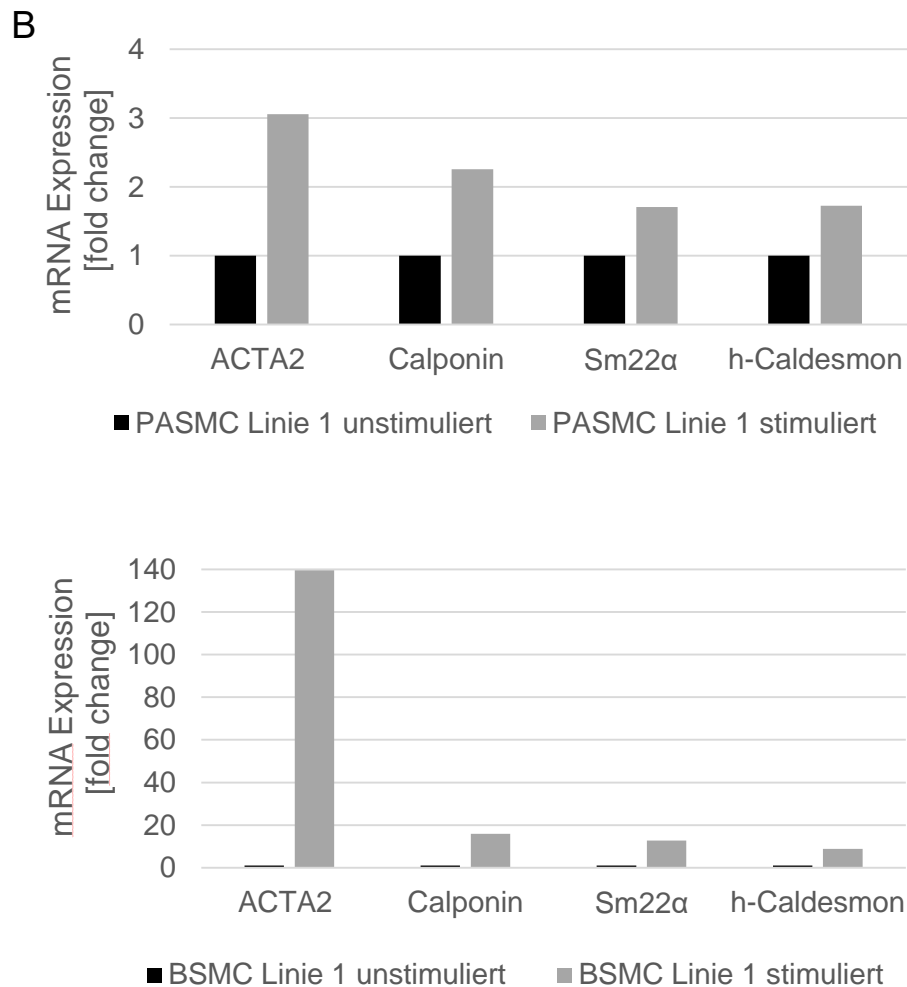


Abbildung 26: Erhöhung der Genexpression glattemuskelspezifischer Marker in Glattemuskulenzellen. Primäre BSMC sowie Zellen einer BSMC und PASM Line 1 wurden entweder für drei Tage im Stimulierungsmedium (Ham's F12/DMEM + 5% FBS + 5ng/ml TGF-β1 und 0,7 % B27 oder im Glattemuskulenzellmedium kultiviert. Danach wurde die RNA der Zellen isoliert und die Expression der Gene (ACTA2, Sm22, Calponin, h-Caldesmon) mittels qRT-PCR ermittelt. A) Analyse der Expressionen der primären BSMC im unstimulierten und stimulierten Zustand. Die Expressionen wurden gegen die der Referenzgene GAPDH und β2M normalisiert und die „fold“-Expressionen durch Einbeziehung der Expressionen der unstimulierten Zellen berechnet. B) Analyse der Genexpressionen in den Linien vor und nach Stimulation. Normalisiert wurde gegen die Expressionen der Referenzgene GAPDH und β2M. Die „fold“-Expressionen wurden durch Einbeziehung der Expressionen der unstimulierten Zellen berechnet. n=1.

3.3.3 Analyse der Funktionalität mit Hilfe des Calciumindikators Fluo-4

Die Expression der Marker spiegelt eine wichtige Seite des Phänotyps wider. Ein anderer entscheidender Teil ist die Funktionalität, wobei die wichtigste Funktion der Glattemuskulenzellen die Kontraktion ist und diese somit untersucht wurde. Hierbei wird zwischen der calciumabhängigen und calciumunabhängigen Kontraktion unterschieden (Harnett und Biancani 2003; Sanders 2008). Bei der calciumabhängigen Kontraktion kommt

es nach Ausbildung eines Aktionspotentials oder durch Hormon/Neurotransmitter-Stimulation zur Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Pollard und Earnshaw 2007; Alberts et al. 2015; Lam, Lamanna und Bourke 2019). Ca^{2+} binden an das regulatorische Protein Calmodulin. Der Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex aktiviert die *myosin light chain kinase* (MLCK), die daraufhin die leichte Kette des Myosins phosphoryliert. Querbrückenbindungen mit Aktin entstehen und Kraft wird generiert. Bei der calicunabhängigen Kontraktion wird die MLCK durch Ca^{2+} -unabhängige Kinasen phosphoryliert (Harnett und Biancani 2003; Sanders 2008). Unter physiologischen Bedingungen fällt dieser Signalweg jedoch kaum ins Gewicht. Für die nächsten Experimente wurde der Fokus daher auf die calciumabhängige Kontraktion gelegt. Hierzu wurde zunächst mittels des Calciumindikators Fluo-4 die Ausschüttung von Calcium in lebenden Zellen nach Rezeptorstimulation untersucht. Der Test ermöglicht die Beobachtung von Aktionspotentialen einzelner Zellen in Echtzeit (Liu 2018). Somit lässt sich mit Hilfe des Assay indirekt auf das Vorhandensein wichtiger G-Protein-gekoppelter Rezeptoren auf der Oberfläche der Glattmuskelzellen schließen. Für den Test wurden die Zellen zunächst mit dem Calciumsensor beladen und anschließend über G Protein-gekoppelte Rezeptoren stimuliert. Kommt es Aufgrund der Stimulation in der Zelle zur Ausschüttung von Calcium, so wird dies vom fluoreszierenden Calciumindikator gebunden und das Fluoreszenzsignal wird verstärkt (Liu et al. 2018). Der Vorteil von Fluo-4 im Vergleich zu anderen Fluoreszenzindikatoren ist die geringe Hintergrundfluoreszenz, kurze Inkubationszeiten und die einfache Anregung mit einem Argonlaser (488nm) (Liu 2018). Um die Funktionalität des Versuchs zu testen, wurden BSMC mit dem Calciumindikator beladen und im Anschluss lediglich mit PBS oder dem Ionophor Ionomycin behandelt. PBS diene als Vehikelkontrolle, da die Agonisten der nachfolgenden Experimente in PBS rekonstituiert wurden und ausgeschlossen werden musste, dass nur die Stimulation mit PBS bereits einen Einfluss auf die Calciumfreisetzung in der Zelle hat. Zur Analyse wurden die Zellen über einen bestimmten Zeitraum mittels Zeitraffer-Mikroskopie beobachtet. Dargestellt sind drei ausgewählte Zeitpunkte (0 s, 25 s und 80 s), wobei sich zeigte, dass die Zugabe von PBS zu keinem Zeitpunkt eine Induktion der Fluoreszenz verursachte und somit eine Ca^{2+} Ausschüttung durch PBS ausgeschlossen werden konnte (Abbildung 27). Als Positivkontrolle für den Assay wurde der Ca^{2+} -Transporter Ionomycin verwendet. Dieser sorgt für eine intrazelluläre Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration (Morgan und Jacob 1994; Nakamura et al. 2016). Während das 0 s Bild die Hintergrundfluoreszenz zeigt, sind in den Aufnahmen nach 25 s und 80 s die Fluoreszenzintensitäten nach Stimulation zu erkennen. Bei Betrachtung dieser Aufnahmen sieht man eine deutliche Erhöhung des Fluoreszenzsignals. Somit ist die Funktionalität des Tests bestätigt und kann für die Testung von Agonisten verwendet werden.

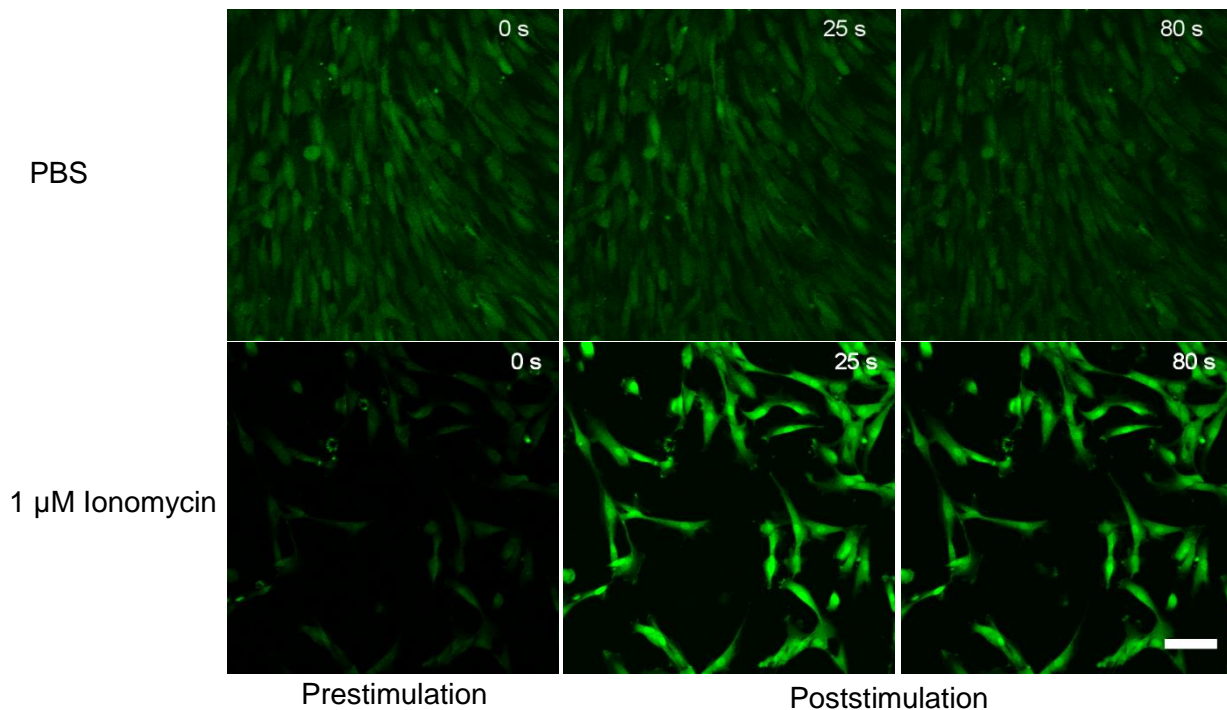


Abbildung 27: Überprüfung der Funktionalität des Fluo-4 Calciumtests. Zellen der BSMC Linie 1 wurden mit dem Calciumindikator Fluo-4 beladen. Anschließend wurden die Zellen entweder mit der Vehikelkontrolle PBS oder dem Ionophor Ionomycin stimuliert. Ionomycin wurde als Positivkontrolle des Versuchs verwendet. Es fungiert als Ca^{2+} -Transporter und erhöht die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration durch das Einströmen von Ca^{2+} . Die Zugabe der Stimulanzien erfolgte in den Sekunden 1-3, sodass 0 s die Hintergrundfluoreszenz zeigt. Die Veränderung der Fluoreszenzintensität wurde sekundlich mittels Zeitraffer-Mikroskopie festgehalten. Davon sind jeweils drei Zeitpunkte (0 s, 25 s und 80 s) einer Messung ausgewählt und abgebildet worden. Messbalken 100 μm . Abbildungen einer repräsentativen Messung. n=2-3.

Ein bedeutender Agonist im Bereich der Glattmuskulatur ist Histamin (Barnes 2001; Yamauchi und Ogasawara 2019). Histamin wirkt als Gewebshormon und Neurotransmitter und spielt eine zentrale Rolle bei allergischen Reaktionen und der Abwehr körperfremder Stoffe. Histamin wirkt auf die Atemwegsmuskulatur kontrahierend und erhöht die Permeabilität kleinerer Gefäße (Barnes 2001). Es bindet an G-Protein-gekoppelte Histaminrezeptoren, von denen in Atemwegsglattmuskelzellen hauptsächlich der Histamin H1- und der Histamin H2-Rezeptor exprimiert werden (Thangam et al., 2018). Um die Expression von Histaminrezeptoren in den entstandenen Glattmuskelzelllinien nachzuweisen, wurden die Zellen nach Beladung mit Histamin stimuliert (Abbildung 28). Es ist deutlich zu erkennen, dass es bei den getesteten Glattmuskelzelllinien (BSMC, PASMC, ASMC (COPD)) zum Einströmen von Ca^{2+} kam, da das Fluoreszenzsignal nach Stimulation mit 1 μM Histamin deutlich verstärkt wurde. Zusätzlich ließen sich Unterschiede in den Fluoreszenzsignalen erkennen. Während BSMC nach Stimulation mit Histamin schnell wieder das Fluoreszenzlevel der Hintergrundfluoreszenz erreichten, zeigten PASMC und ASMC (COPD) bis zum Ende der Messung eine deutliche Verstärkung des

Fluoreszenzsignals. Unabhängig von den Glattmuskelzelllinien wurde auch eine Fibroblastenzelllinie auf die Anwesenheit von Histaminrezeptoren getestet. Auch hier war nach Stimulation mit 1 μM Histamin eine Verstärkung des Fluoreszenzsignals zu erkennen, die aber zum Ende der Messung wieder auf Hintergrundfluoreszenzlevel absank.

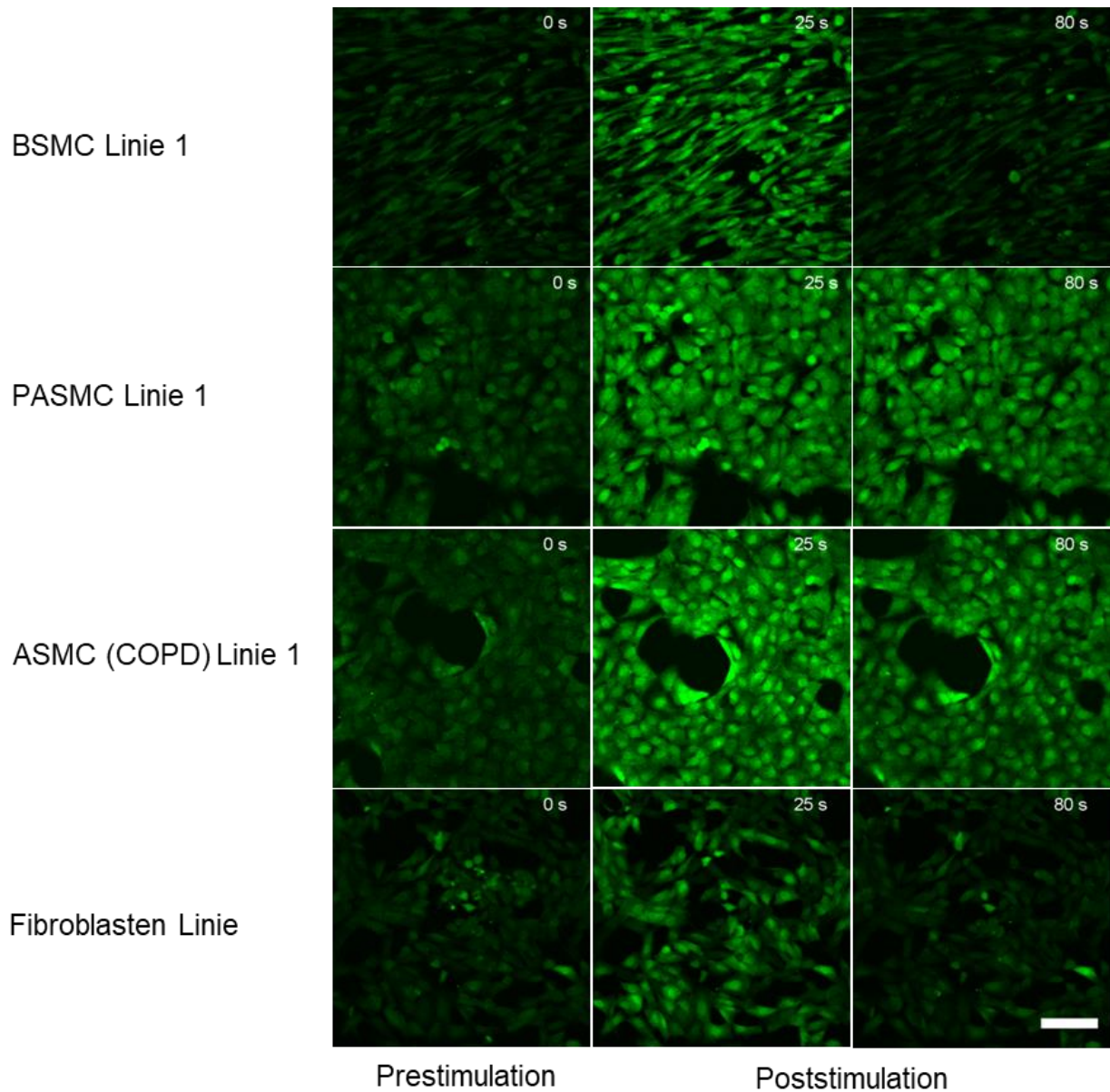


Abbildung 28: Nachweis von Histaminrezeptoren auf der Oberfläche der Glattmuskellinien mittels des Fluo-4 Tests. Um das Einströmen von Ca^{2+} in die Zelle nach Histaminstimulation zu untersuchen, wurden die Zellen zunächst mit Fluo-4 Direkt™ beladen. Anschließend wurden sie unter dem Mikroskop mit 1 μM Histamin behandelt und das Fluoreszenzsignal am Laser-Scanning-Mikroskop (LSM) über die Zeit beobachtet. Repräsentativ abgebildet sind jeweils drei ausgewählte Zeitpunkte (0 s, 25 s und 80 s) einer Messung. Stimuliert wurden die BSMC, PASMC und ASMC (COPD). Als Kontrolle wurde eine Fibroblastenlinie mitgetestet. Messbalken 100 μm . Abbildungen einer repräsentativen Messung. n=2.

Um die unterschiedlichen Fluoreszenzsignale über die Zeit besser miteinander vergleichen zu können, wurden sie im nächsten Schritt mit Hilfe eines ImageJ Makros ausgewertet und in Graphen dargestellt. Das Makro erlaubt dabei die Analyse des Fluoreszenzsignals von einzelnen Zellen beziehungsweise Flächen anhand der Bestimmung von Pixeln über die Zeit (Abbildung 29). Die Auswertung der Signale erfolgte anschließend über Excel. Hierfür wurden die Signale zum Hintergrundfluoreszenzsignal relativiert und gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 29 B). Für die Analyse wurden pro Messung die Signale von 40-80 Zellen ausgewertet. Dadurch ergeben sich drei Graphen: einer für das durchschnittliche Fluoreszenzsignal über die Zeit und jeweils ein Graph für die positive beziehungsweise negative Standardabweichung vom Mittelwert. Um die Zusammengehörigkeit der drei Graphen übersichtlicher darzustellen, wurden die Flächen zwischen den Graphen farblich gefüllt (Abbildung 29 C).

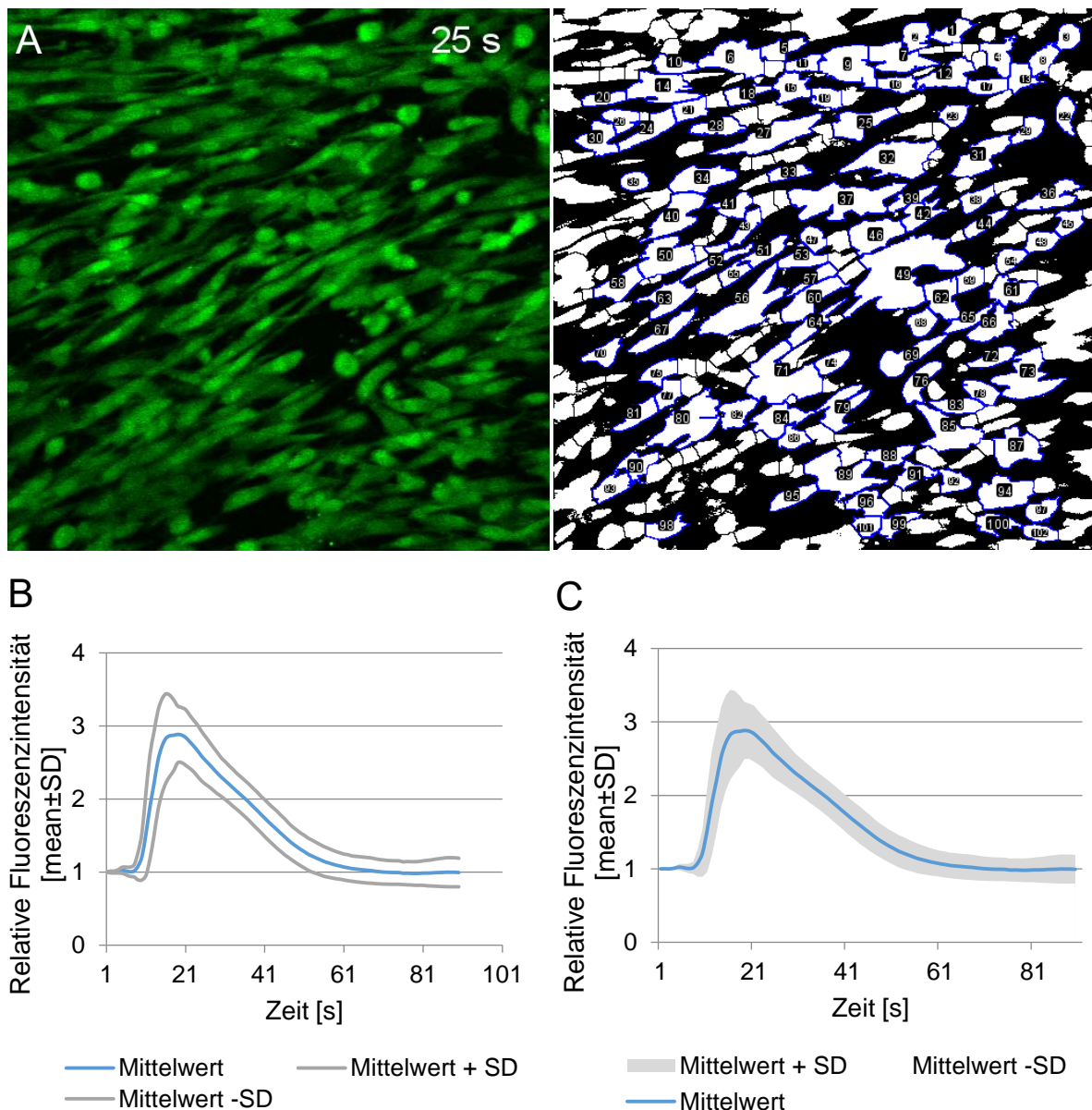


Abbildung 29: Graphische Darstellung der Fluoreszenzsignale mittels ImageJ. BSMC der Linie 1 wurden mit Fluo-4 Direkt™ beladen und unter dem Mikroskop mit 1 μM Histamin stimuliert. Es wurden Zeitrafferaufnahmen gemacht. Diese Bilddateien wurden mittels eines Macros über ImageJ ausgewertet (A). Dafür wurde das Multicolorbild in ein 8 bit schwarz-weiß Bild umgewandelt. Unspezifische Hintergrundsignale wurden minimiert und der Kontrast verstärkt. Anschließend wurden mit Hilfe des „Auto Thresholds“ Zellen beziehungsweise Bereiche für die Analyse voneinander getrennt. Für alle getesteten Linien erzielte hierbei die „Li white“-Methode die besten Abtrennergebnisse. Die abgetrennten Zellen/Bereiche wurden durchnummeriert und das Signal dieser Bereiche über die Zeit bestimmt. Um apoptotische Zellen oder unspezifische Partikel auszuschließen, wurden für die Analyse nur Partikel einer bestimmten Größe analysiert. B) die Werte der Fluoreszenzsignale wurden zu den Hintergrundfluoreszenzsignalen relativiert und graphisch gegen die Zeit aufgetragen. Dafür wurde der Mittelwert der Signale von 80 verschiedenen Zellen ermittelt sowie zusätzlich die Standardabweichungen in positiver sowie negativer Richtung abgetragen. C) Um die Zusammengehörigkeit der drei Graphen zu verdeutlichen, wurden die Flächen zwischen den Linien farbig dargestellt.

Damit ergibt die Auswertung der Fluoreszenzmikroskopie-Bilder folgende Graphen (Abbildung 30). Die BSMC zeigen eine Verdreifachung der Fluoreszenzintensität. Die Spitze des Signals wurde nach ungefähr 18 Sekunden erreicht. Danach sank die Fluoreszenzintensität linear ab und erreichte nach ungefähr einer Minute die gleiche Fluoreszenzintensität wie zu Beginn der Messung. Bei den PASMOC war nach Stimulation mit 1 μM Histamin eine Verdopplung des Signals zu beobachten. Außerdem war zu erkennen, dass die Signalstärke bis zum Ende der Messung nahezu stabil blieb und deutlich über dem Ausgangswert lag. Dies war auch bei den ASMC (COPD) zu sehen. Hier erreichte die Fluoreszenzintensität circa 16 Sekunden nach Stimulation das Dreifache des Ausgangswerts. Bis zum Ende der Messung sank die Intensität etwas ab, jedoch war auch 90 Sekunden nach Stimulationsbeginn noch eine Verdopplung der relativen Fluoreszenzintensität zu beobachten. Fibroblasten zeigten einen späteren sowie auch schwächeren Signalanstieg, der wie bei den BSMC zum Ende der Messung auf das Niveau der Ausgangswerte absank.

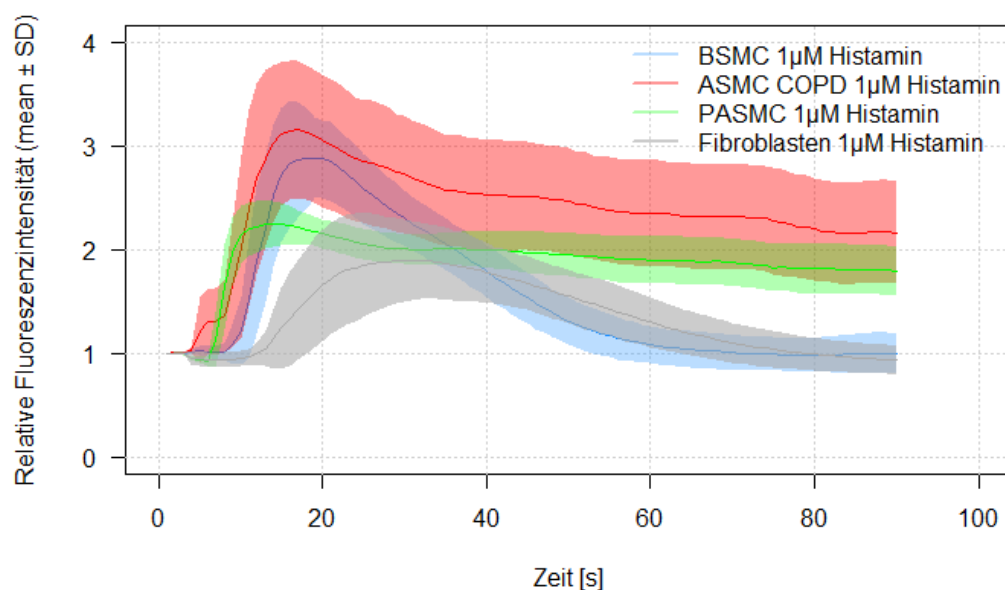


Abbildung 30: Anstieg der Fluoreszenzintensität in verschiedenen Linien nach Stimulation mit 1 μM Histamin. Zur Messung der Änderung der Fluoreszenz wurden die Zellen mit dem Calcium Indikator Fluo-4 Direkt™ beladen. Anschließend wurden die Zellen am Mikroskop mit 1 μM Histamin behandelt und das Fluoreszenzsignal über die Zeit aufgezeichnet. Dargestellt sind die Ergebnisse der BSMC Linie 1, der PASC Line 1, der ASC (COPD) Linie 1 und der Kontroll-Fibroblastenlinie. Die Daten, die mit Hilfe des konfokalen Mikroskops aufgenommen wurden, wurden mittels ImageJ ausgewertet und mit der Statistik Software R in Graphen abgebildet. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von 67-70 Zellen einer Messung \pm Standardabweichung.

Im nächsten Versuch wurden die dosisabhängigen Reaktionen der verschiedenen Linien auf Histamin untersucht. Hierbei wurden Histaminkonzentrationen im Bereich von 0,1 μM -100 μM verwendet (Abbildung 31). Erst ab Histaminkonzentrationen von 1-100 μM Histamin wurde bei den BSMC ein Anstieg der Fluoreszenzintensität und somit ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beobachtet. Bei 0,1 μM Histamin war keine Änderung der Fluoreszenzintensität zu beobachten. Die Stimulation mit Histaminkonzentrationen von 1-100 μM führte zur Verdreifachung der Signalstärke. Weiterhin ist zu erkennen, dass mit zunehmender Konzentration der Signalanstieg steiler war, da die Zellen noch synchroner, aber auch um 1-2 Sekunden schneller, mit dem Einströmen von Ca^{2+} reagierten. Bei Konzentrationen von 10-100 μM Histamin nahm die relative Fluoreszenzintensität bis zum Ende der Messung deutlich ab, erreichte jedoch nicht die Ausgangsintensität, wie es bei Stimulation mit 1 μM Histamin zu beobachten war. Im Vergleich zu den BSMC reagierten PASC und ASC (COPD) bereits auf 0,1 μM Histamin, wie die Signalanstiege zeigen. Die dosisabhängigen Reaktionen der höheren Konzentrationen waren vergleichbar. Bei den PASC wurde bei den Histaminkonzentrationen von 1-100 μM eine Verdopplung der relativen Fluoreszenzintensität detektiert. Die Signalstärke blieb bis zum Ende der Messung nahezu konstant. Bei ASC (COPD), die mit 10-100 μM Histamin stimuliert wurden, konnte bis zum Ende der Messung eine 2-2,5 fache Steigerung der relativen Fluoreszenzintensität detektiert werden. Die Signalstärke blieb während der Messung konstant. Bei geringerer Histaminkonzentration (1 μM) wurde sogar eine Verdreifachung des Signals beobachtet. Bis zum Ende der Messung reduzierte sich die Signalstärke auf das Doppelte der Ausgangswerte.

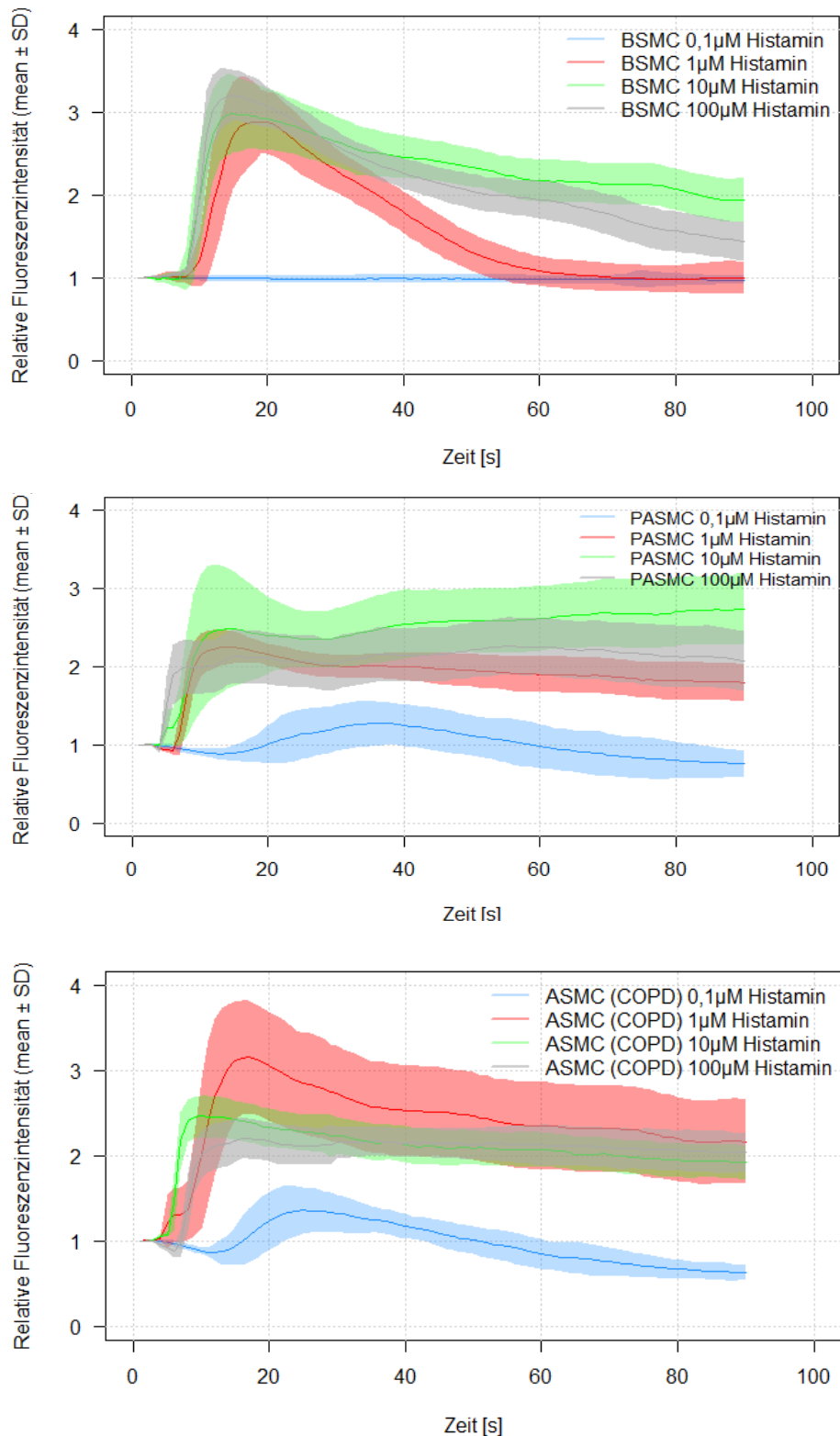


Abbildung 31: Dosisabhängige Reaktionskurven von Histamin in verschiedenen Glattnuskelzellen. Glattnuskelzellen der BSMC Linie 1, der PASC Linie 1 und der ASMC (COPD) Linie 1 wurden mit Fluo-4 Direkt™ beladen. Anschließend wurden die Zellen am Zeit-Raffer Mikroskop mit verschiedenen Histaminkonzentrationen (0,1 μM-100 μM) stimuliert. Die Daten wurden mittels ImageJ ausgewertet und durch die Statistik-Software R in Graphen abgebildet. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von 70 Zellen einer Messung ± Standardabweichung. Ausnahme: n=51 PASC bei Stimulation mit 0,1 μM Histamin.

Neben den Linien wurden auch die primären BSMC auf die Expression des Histaminrezeptors untersucht (Abbildung 32). Hierbei war zu erkennen, dass die Reaktionen der pBSMC auf Histamin sehr ähnlich denen der immortalen BSMC (Abbildung 31) waren. So war zu erkennen, dass es bei den pBSMC, wie auch bei den immortalen BSMC, erst ab Histaminkonzentrationen von 1-100 μM zum Einstromen von Ca^{2+} in den Zellen kam. Auch ist zu erkennen, dass mit zunehmender Histaminkonzentration ein stärkerer Anstieg der Fluoreszenzintensität zu beobachten war. So kam es bei Stimulation mit 100 μM Histamin fast zu einer Vervierfachung der Signalstärke. Abbildung 32 zeigt außerdem, dass die relative Fluoreszenzintensität bei Behandlung der Zellen mit 1 μM Histamin nach Beendigung der Messung wieder auf die Anfangsintensität absank, was nicht bei den höheren Konzentrationen wahrzunehmen war.

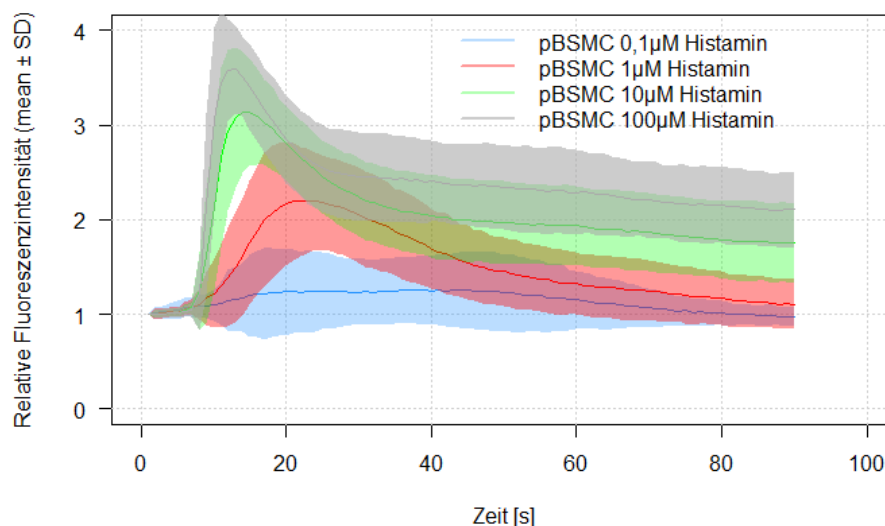
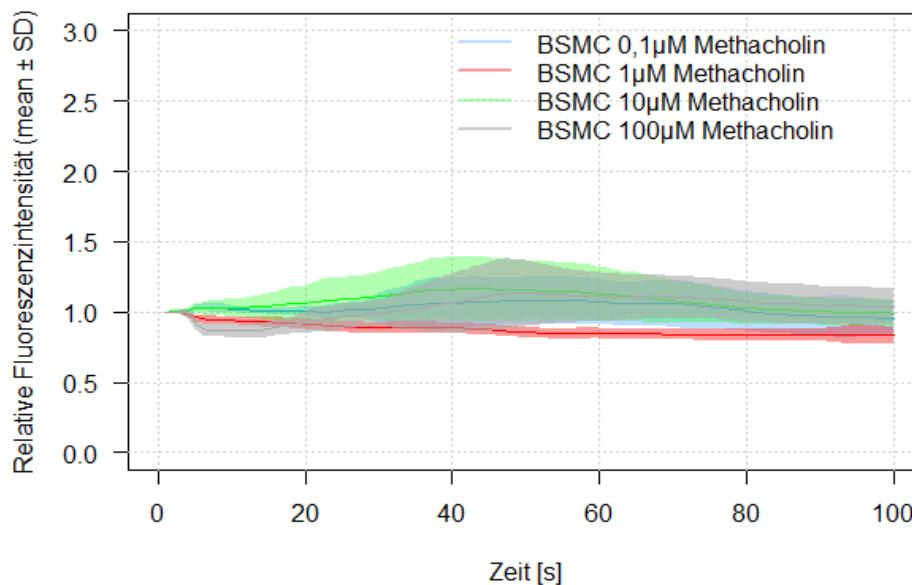


Abbildung 32: Stimulation primärer BSMC mit verschiedenen Histaminkonzentrationen. Primäre BSMC wurden mit Fluo-4 Direkt™ beladen. Anschließend wurden die Zellen am Zeit-Raster Mikroskop mit verschiedenen Histaminkonzentrationen (0,1 μM -100 μM) stimuliert. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels ImageJ. Die Graphen wurden mit der Statistik-Software R erzeugt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von 69 Zellen einer Messung \pm Standardabweichung.

Neben Histamin ist Methacholin als weiterer wichtiger Agonist im Zusammenhang mit der Kontraktion der Atemwegsglattmuskulatur zu nennen (Buels und Fryer 2012; Kim et al. 2015). Methacholin, ein Derivat von Acetylcholin, wirkt als nicht selektiver Agonist der Muskarinrezeptoren von denen die Rezeptoren M_2 und M_3 in Glattmuskelzellen exprimiert werden (Ehlert, Gregory und Evette 1999). Methacholin wird zur Erkennung von Asthma verwendet. Bereits geringe Mengen von Methacholin führen in asthmatischen Atemwegen zur Hyperreaktivität und damit verbunden zur Bronchokonstriktion- der Verengung der Bronchien (Kim et al. 2015). In Abbildung 33 wurden die Linien mit verschiedenen

Methacholinkonzentrationen stimuliert. Dabei konnte beobachtet werden, dass BSMC nicht auf Methacholin reagierten und es somit nach Stimulation über den Muskarinrezeptor nicht zum Ca^{2+} -Einstrom kam. Dies war ebenfalls bei der Stimulation der dazugehörigen primären Zellen zu beobachten. Alle getesteten Methacholinkonzentrationen führten nicht zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität. Dahingegen zeigten die ASMC (COPD) bei Stimulation mit 0,1 μM Methacholin eine Verdopplung der Fluoreszenzintensität. Der Höhepunkt des Signals wurde ungefähr 55 Sekunden nach Stimulation erreicht. Anders als bei der Stimulation mit Histamin flachte die Kurve nach dem Erreichen des Höhepunkts bis zum Ende der Messung fast auf Basallevel ab. Bei Erhöhung der Methacholinkonzentration auf 1 μM war keine Reaktion der ASMC (COPD) mehr zu beobachten. Neben Atemwegsglattmuskelzellen wurden auch Fibroblasten mit Methacholin behandelt. Diese zeigten bei Stimulation von 1 μM -100 μM Methacholin eine 2-2,5 fache Verstärkung der Fluoreszenzintensität. Des Weiteren ließ sich aus Abbildung 33 erkennen, dass der Höhepunkt der Fluoreszenzsignale bei Fibroblasten bereits innerhalb der ersten 10-15 Sekunden erreicht wurde und diese bis zum Ende der Messungen stetig abnahmen.



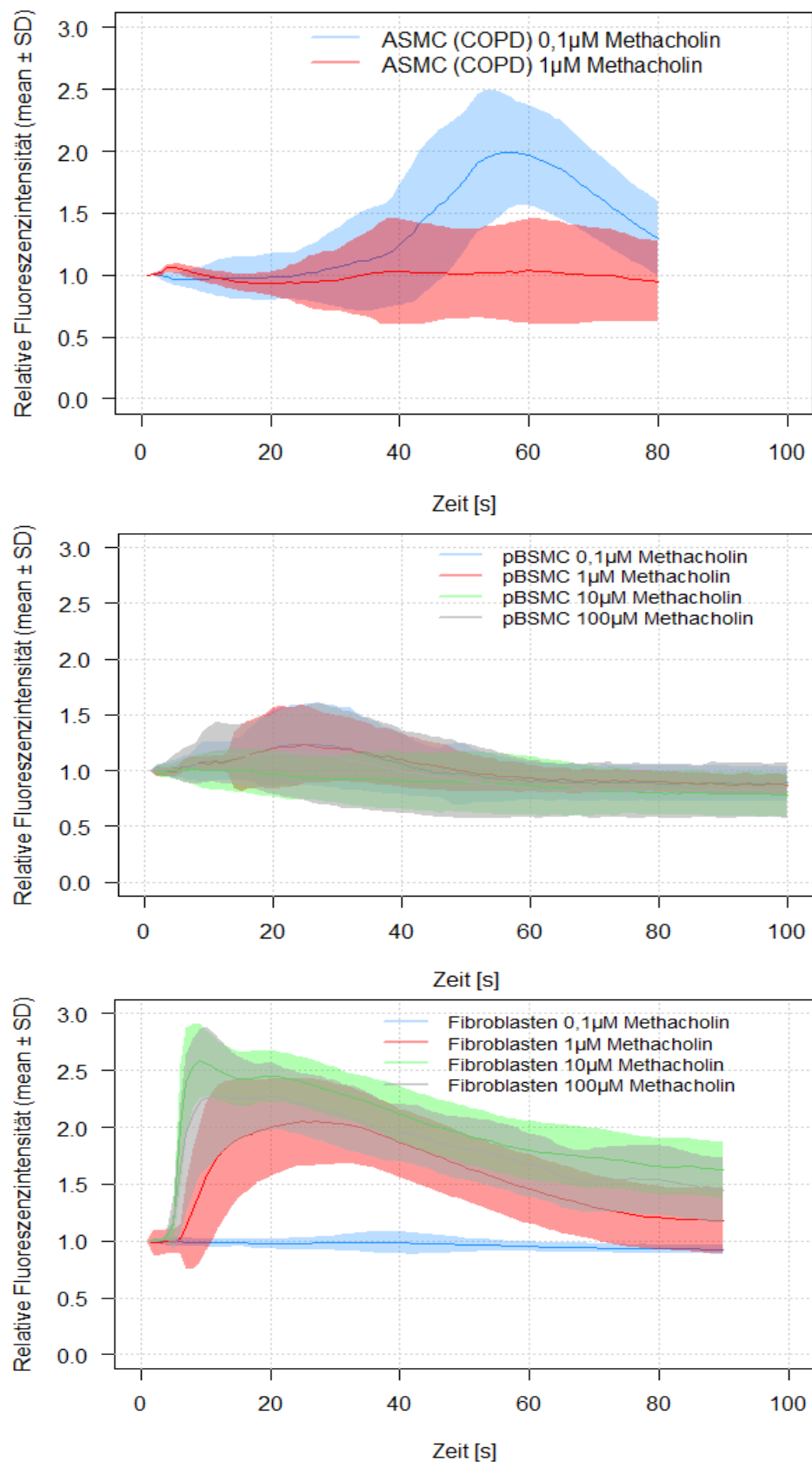


Abbildung 33: Dosisabhängige Reaktionskurven von Methacholin in Atemwegsmuskelzellen. Glattmuskelzellen der BSMC Linie 1, der ASMC (COPD) Linie 1, der pBSMC und Fibroblasten wurden mit Fluo-4 Direkt™ beladen und am Zeitraffer-Mikroskop mit verschiedenen Methacholinkonzentrationen (0,1 μM-100 μM) stimuliert. Zur Datenauswertung wurde die Software ImageJ verwendet. Die graphische Darstellung erfolgte mittels der Statistik Software R. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus 50-70 Zellen einer Messung ± Standardabweichung.

Der Neurotransmitter Serotonin ist ein Bestandteil des Serums und bewirkt in der Glattmuskulatur der Blutgefäße, die Regulierung des Tonus (Ullmer et al. 1995; Barnes 2001). Serotonin wird aus der Aminosäure L-Tryptophan aufgebaut und bindet an die G-Protein-gekoppelten 5 HT-Rezeptoren, wodurch es zum intrazellulären Calciumflux kommt. PASCs sowie Fibroblasten wurden mit zwei verschiedenen Serotoninkonzentrationen stimuliert (Abbildung 34). PASCs waren über die 5 HT-Rezeptoren stimulierbar. Sowohl 1 μ M als auch 10 μ M Serotonin führten zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität. Der höchste Signalanstieg wurde bei beiden verwendeten Konzentrationen ungefähr zeitgleich, 56 Sekunden nach Stimulationsbeginn, beobachtet. Anschließend war eine graduelle Abnahme des Signals festzustellen. Im Gegensatz dazu zeigten Fibroblasten keine Signalveränderung nach Serotoninstimulation.

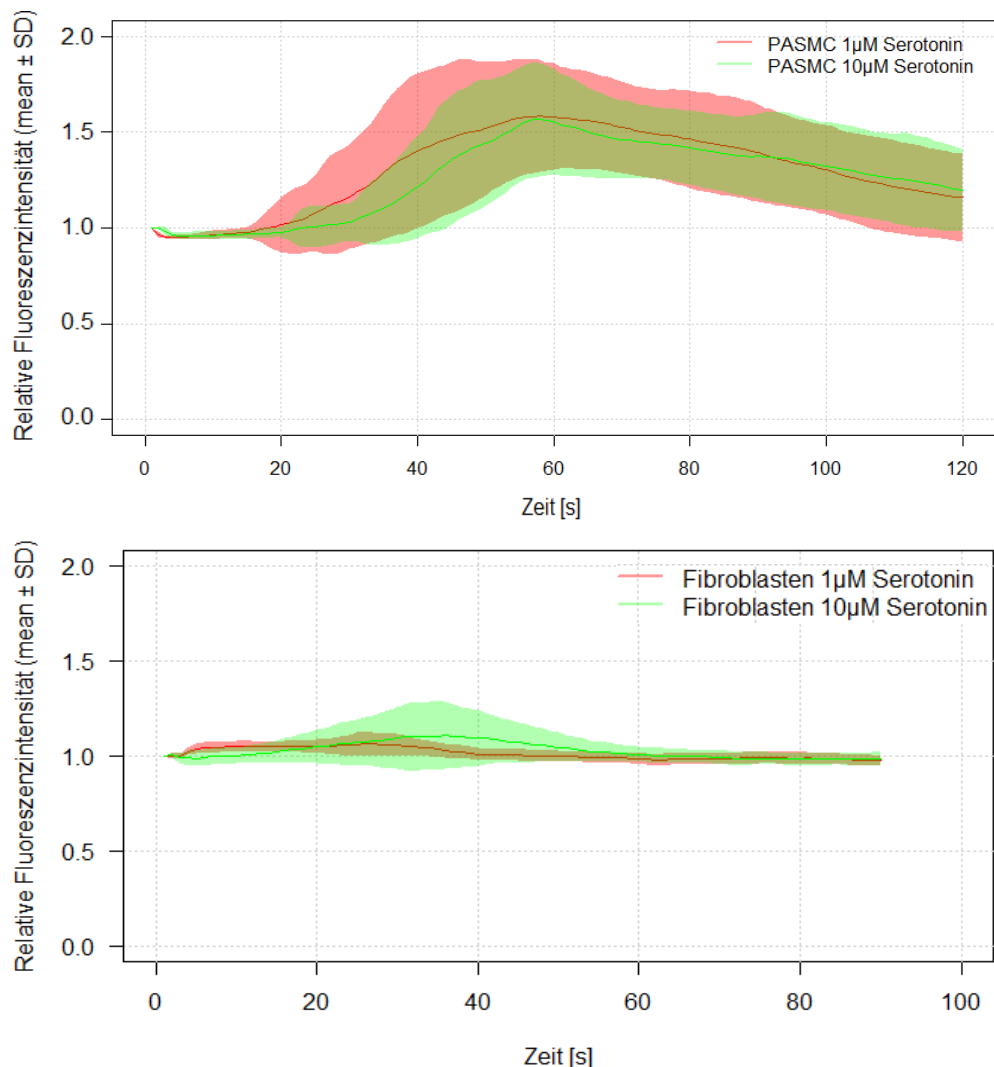


Abbildung 34: Konzentrationsabhängige Reaktionskurven von Serotonin in PASCs und Fibroblasten. PASCs der Linie 1 und Zellen einer Fibroblasten Zelllinie wurden mit dem Fluo-4 Direkt™ beladen. Danach wurden sie mit zwei verschiedenen Serotoninkonzentrationen am konfokalen Mikroskop stimuliert und über die Zeit beobachtet. Die Daten wurden mit Hilfe von ImageJ ausgewertet und durch die Statistik-Software R in Graphen abgebildet. Es wurden jeweils die Mittelwerte von 32-50 Zellen einer Messung dargestellt \pm Standardabweichung.

Bislang wurden die Zellen vor der Stimulierung im normalen Zellkulturmedium kultiviert. Da aber in vorherigen Versuchen die Stimulation der Zellen mit TGF- β 1 und B27 zu einem deutlichen Anstieg der Markerexpression geführt hat, wurde im nächsten Versuch der Effekt von TGF- β 1 und B27 auf das Einströmen von Ca^{2+} in PASMC untersucht. Dafür wurden die Zellen für zwei Tage im Stimulierungsmedium mit TGF- β 1 und B27 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Fluo-4 beladen und am konfokalen Mikroskop mit Serotonin stimuliert. Es konnten keine größeren Unterschiede im Anstieg der Fluoreszenzintensität zwischen den differenzierten Zellen und den Zellen, die im normalen Kultivierungsmedium kultiviert wurden, festgestellt werden (Abbildung 35).

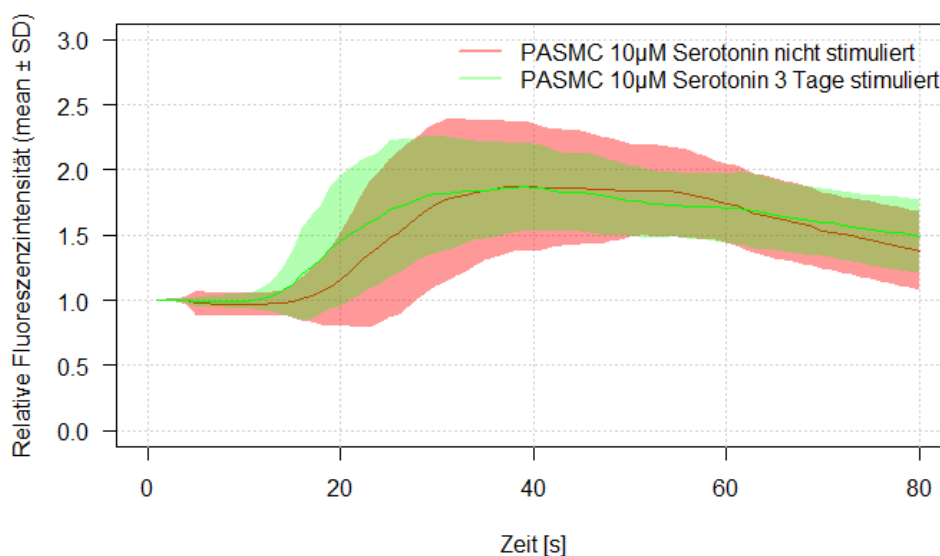


Abbildung 35: Messung des Ca^{2+} - Influx nach Vorstimulation mit TGF- β 1 und B27 in PASMC. Zellen der PASMC Linie 1 wurden für zwei Tage im Stimulierungsmedium mit TGF- β 1 und B27 inkubiert. Danach wurden die Zellen mit Fluo-4 beladen und der Calciumflux nach Stimulation mit 10 μM Serotonin gemessen. Als Kontrolle wurden PASMC, die im normalen Kultivierungsmedium kultiviert wurden, mit 10 μM Serotonin behandelt. Zur Datenauswertung wurde die Software ImageJ verwendet. Die graphische Darstellung erfolgte mittels der Statistik Software R. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von 50 Zellen einer Messung \pm Standardabweichung.

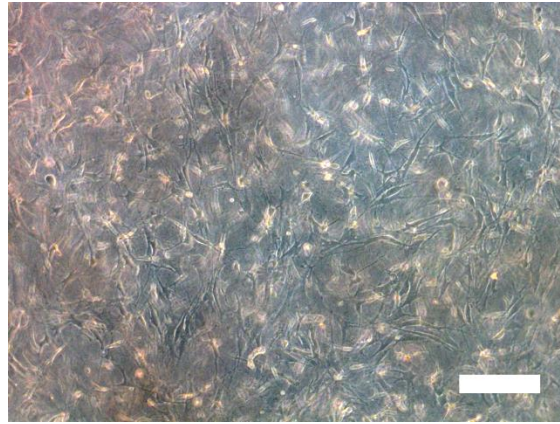
3.3.4 Nachweis der Kontraktion

Mit den gezeigten Daten konnte indirekt die Anwesenheit wichtiger G-Protein-gekoppelter Rezeptoren nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass es durch Rezeptorstimulation zum Einströmen von Ca^{2+} in die Zelle kam. Diese Daten gaben erste Hinweise bezüglich der Kontraktion der Glattmuskelzelllinien, konnten die Kontraktion an sich allerdings nicht nachweisen. Diese wurde in den nächsten Experimenten untersucht.

3.3.4.1 Kollagengel Kontraktions-Assay

Ein Assay mit dem die Kontraktion von Glattmuskelzellen in der Literatur oft nachgewiesen wird, ist der Kollagengel Kontraktions-Assay (Sakota et al. 2014; Kumar et al. 2017). Hierbei werden die Zellen in ein Kollagengel eingebettet. Kollagen ist eines der bedeutendsten Proteine der extrazellulären Matrix und zeichnet sich durch seine hohe Zugfestigkeit aus (Alberts et al., 2015). Die eingebetteten Zellen werden anschließend beispielsweise mit GPCR-Agonisten stimuliert, wodurch die Kontraktion der Zellen im Gel induziert wird. Ca^{2+} strömt in die Zelle und bindet an Calmodulin. Der entstandene Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex aktiviert die MLCK, die daraufhin die leichte Kette des Myosins phosphoryliert. Es kommt zu Querbrückenbindungen mit Aktin, Kraft wird generiert und die Kontraktion ausgelöst. Durch das Zusammenziehen der Zellen wird das gesamte Kollagengel zusammengezogen. Zum Nachweis der Kontraktion wurden die Zellen zunächst in ein Kollagengel eingebettet. Dabei stellte sich heraus, dass sich eine Kollagenkonzentration im Gel von 55 % eignete (Abbildung 36 A). Nach zweitägiger Kultivierung im Gel waren die Zellen ausgestreckt und es ließ sich ansatzweise erkennen, dass sich die Zellen in verschiedenen Gelschichten anlagerten. In Abbildung 36 B sind die Gele von fünf Wells vor sowie nach der Stimulation mit 1 mM Histamin dargestellt. Bereits vor der Stimulation ließ sich feststellen, dass sich einige Gele vom Wellrand gelöst hatten und anfangen sich zusammenzuziehen. 15 Minuten nach Zugabe von Histamin war eine deutliche Verkleinerung von drei von fünf Gelen zu beobachten (Well 1, 4, 5). Dieser Effekt war allerdings auch nach Zugabe von PBS zu detektieren und lässt sich entweder durch eine Spannung im Kollagengel ausgelöst durch den Zellverbund oder zellunabhängig durch die Zugfestigkeit des Kollagens erklären. Daher wurde nach einer Alternative gesucht mit der die Kontraktion der Glattmuskelzellen bestimmt werden kann.

A



B

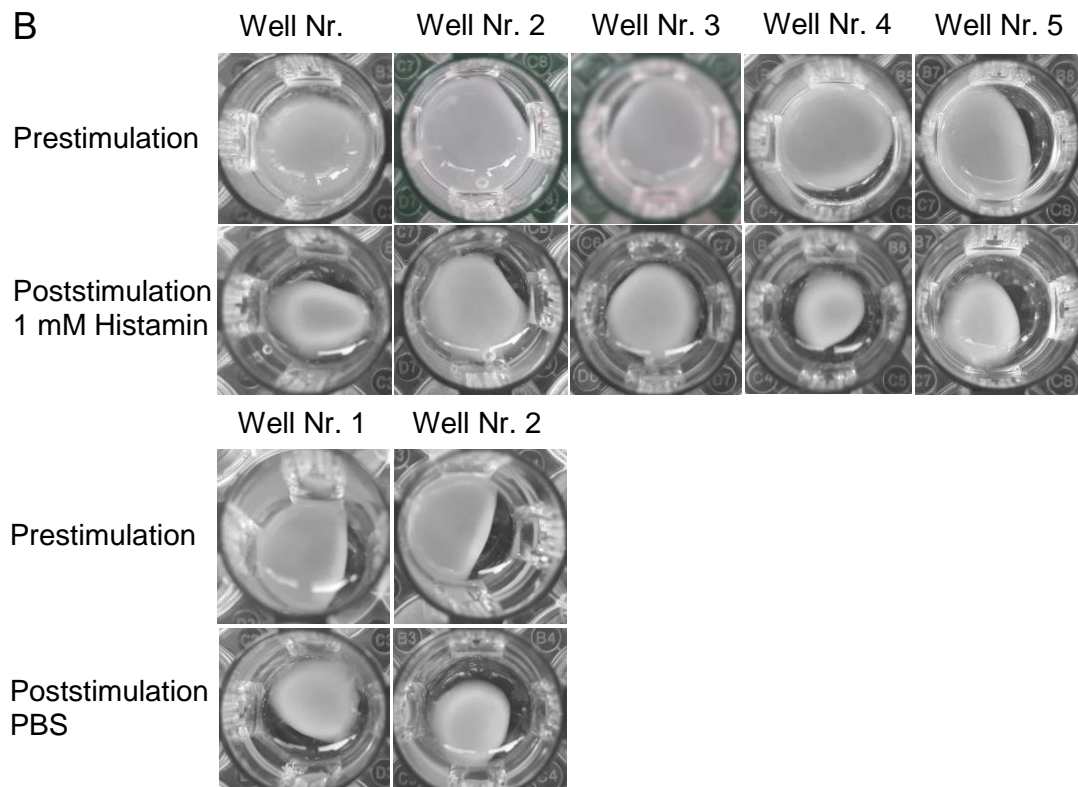


Abbildung 36: Analyse der Kontraktion der BSMC im Kollagengel. Zur Messung der Kontraktion wurden BSMC der Linie 1 in ein 55 % Kollagengel eingebettet. Pro Well wurden dafür 400.000 Zellen ausgesät. Nach dem Aushärten des Gels wurde das Gel mit Glattmuskelmedium bedeckt und die Zellen darin für zwei Tage inkubiert. A) Durchlichtmikroskopische Analyse der Zellen im Gel nach zwei Tagen. Messbalken 200 μ m. B) Stimulation der Zellen im Gel nach zwei Tagen Inkubation. Es wurden sieben Wells analysiert. Die obere Reihe zeigt die Gele im Well vor der Stimulation während in der unteren Reihe die Gele im Well nach 15-minütiger Stimulation mit 1 mM Histamin oder der Vehikelkontrolle PBS dargestellt sind. n=2.

3.3.4.1 Besiedlung dezellularisierter Schweinegerüste zum Nachweis der Kontraktion

In den nachfolgenden Versuchen wurde ein weiterer Ansatz zur Bestimmung der Funktionalität der generierten Linien getestet. Dafür wurden dezellularisierte Präzisionsschnitte einer Schweinelunge mit den immortalen Zellen wiederbesiedelt. Da die Lunge der physiologische Besiedlungsort von Atemwegsglattmuskelzellen ist, wurden porcine Lungen dezellularisiert. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass durch die Dezellularisierung die extrazelluläre Matrix sowie die Strukturen der Lunge erhalten bleiben und eine physiologische Kultivierung der Zellen gewährleistet werden kann. Es erfolgt kein Anheften der Zellen auf unnatürlichen Plastikoberflächen, sondern die Zellen können in natürlicher Umgebung miteinander kommunizieren und im Falle der Kontraktion ein Gerüst zusammenziehen, das nicht am Kulturgefäß befestigt ist. Für die Anfertigung der Lungenpräzisionsschnitte wurde die Expertise des Fraunhofer ITEM genutzt. Die Schweinelunge wurde bei einem Schlachter besorgt und mit einer zweiprozentigen Agaroselösung befüllt (Abbildung 37). Nach dem Polymerisieren der Agarose wurden Atemwegsbereiche aus dem gefüllten Lungenlappen ausgestanzt und diese Stanzungen mittels einer Schneidemaschine in Schnitte mit einem Durchmesser von 8 mm und einer Dicke von 0,3 mm geschnitten. Diese Schnitte wurden anschließend dezellularisiert und mit den immortalisierten Zellen besiedelt.

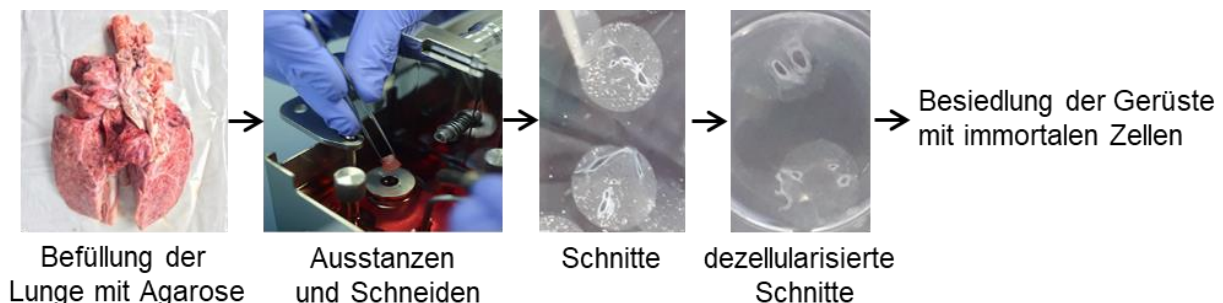


Abbildung 37: Generierung von Lungen-Präzisionsschnitten aus dem Schwein. Teile einer Schweinelunge wurden mit einer 2 % Agaroselösung befüllt. Nach dem Polymerisieren der Agarose wurden Atemwegsbereiche ausgestanzt und mit Hilfe einer Schneidemaschine in Präzisionsschnitte (Durchmesser: 8 mm, Dicke 0,3 mm) geschnitten. Diese wurden für 1-1,5 h mit 1 % Triton dezellularisiert und anschließend mit PBS gewaschen. Für die Besiedlung wurden pro Schnitt 100000 immortale Zellen verwendet.

Um die Besiedlung und die Vitalität der Zellen auf dem Gerüst zu untersuchen wurden die Zellen mit Calcein AM beladen. Calcein AM ist ein membrandurchlässiger Farbstoff (Bratosin, Mitrofan, Palii, Estaquier, & Montreuil, 2005). Lebende Zellen sind in der Lage mittels Esterasen die Acetomethylestergruppe enzymatisch abzuspalten und Calcein AM in das grün-fluoreszierenden Calcein umzuwandeln. Nach dem Beladen wurden die Zellen für

20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und die Schnitte am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop in x-Ebene (Tile Scan) und in y-Ebene (Z-Stack) in den Kanälen Durchlicht und eGFP analysiert. Die Abbildung 38 A zeigt die Färbung eines dezellularisierten Gerüsts vor der Besiedlung. Es ist lediglich das Gerüst im Durchlicht zu erkennen. Abbildung 38 B stellt das Ansiedeln der BSMC auf der dezellularisierten Matrix nach einem Tag dar. Dabei sind auf der linken Abbildung die Daten des eGFP-Kanals dargestellt. Darauf ist zu erkennen, dass sich BSMC auf der Matrix angesiedelt haben. Die Morphologie der BSMC war eher rund und nicht spindelförmig. Um zu sehen, wo sich die Zellen angelagert haben, ist in der rechten Abbildung die Überlagerung des eGFP Kanals und des Durchlicht-Kanals dargestellt. Da es sich um Atemwegsschnitte handelt, sind verschiedene Strukturen der Schweinelunge zu erkennen. Dazu zählen die Atemwege sowie das Parenchym. Auch Blutgefäße können in den Schnitten vorkommen. Atemwegsglattmuskelzellen siedeln sich in-vivo in den Atemwegen an. Die Ansiedlung der BSMC in Abbildung 38 B erfolgte eher zufällig auf dem gesamten Gerüst. Es konnten Zellen im Atemweg detektiert werden, aber die meisten Zellen siedelten sich im Parenchym an.

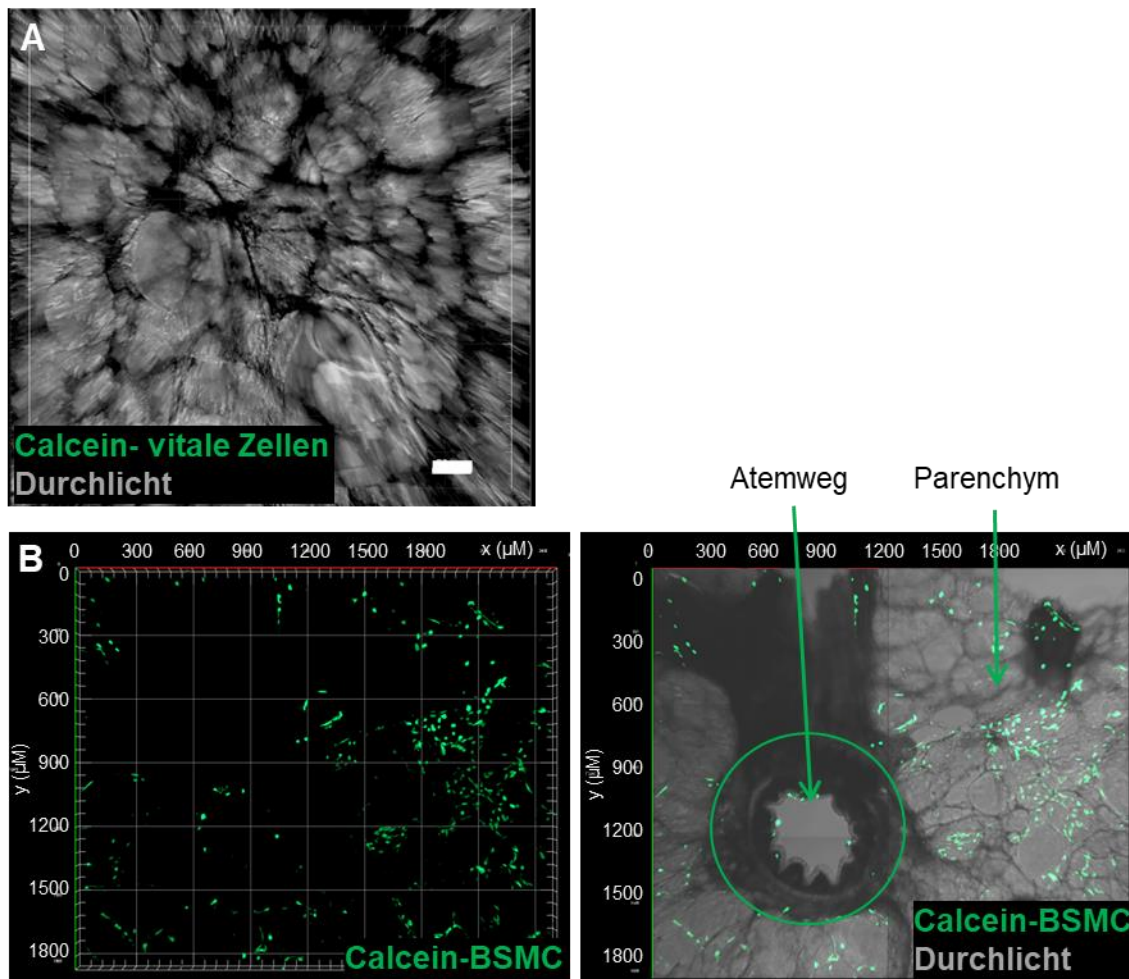


Abbildung 38: Besiedlung der dezellularisierten Lungen-Präzisionsschnitte. A) Zur Bestätigung der Dezellularisierung wurde die Vitalität eines dezellularisierten Schnitts überprüft. Dafür wurde der Schnitt mit 4 μM Calcein AM beladen. Vitale Zellen sind in der Lage Calcein AM durch Esterasen in das grün-fluoreszierende Calcein umzuwandeln. Nach der Inkubation wurde der Schnitt gewaschen und am konfokalen LSM mittels Tile Scan und Z-Stack analysiert. Die Daten wurden anschließend am Imaris ausgewertet. Übereinanderlagerung des Durchlicht und eGFP Kanals. Messbalken 50 μm . B) Dezellularisierte Präzisionsschnitte wurden mit 100000 BSMC der Linie 1/Schnitt wiederbesiedelt. Nach einem Tag wurden die Zellen mit 4 μM Calcein AM inkubiert, mit PBS gewaschen und am konfokalem LSM mit Hilfe von Tile Scan und Z-Stack mit dem eGFP- und Durchlicht-Kanal analysiert. Links: eGFP Kanal; rechts: eGFP und Durchlicht übereinandergelagert. Repräsentative Abbildung, n=2.

Auch die besiedelten Gerüste der PASMC, ASMC (COPD) und Fibroblasten wurden nach einem Tag analysiert. In Abbildung 39 sind die übereinandergelagerten Aufnahmen des eGFP- und des Durchlicht-Kanals gezeigt. ASMC (COPD) sowie Fibroblasten wurden vorab mit Calcein AM beladen, wohingegen PASMC eGFP-markiert waren. Die Daten zeigen, dass sich alle drei Linien auf dem Gerüst anlagerten. Die PASMC siedelten sich hauptsächlich im Bindegewebe um den Atemweg an. Vergleichsweise schienen sich weniger PASMC als beispielweise ASMC (COPD) oder Fibroblasten auf den Gerüsten angesiedelt zu haben und die Morphologie der PASMC sah eher rund als ausgestreckt aus. ASMC (COPD) dagegen hatten sich teilweise schon ausgestreckt. In Abbildung 39 ist ebenfalls zu erkennen, dass

die ASMC (COPD) und auch Fibroblasten sich eher willkürlich und homogen auf dem Gerüst anlagerten. Sie waren im Atemweg sowie im Parenchym nachweisbar.

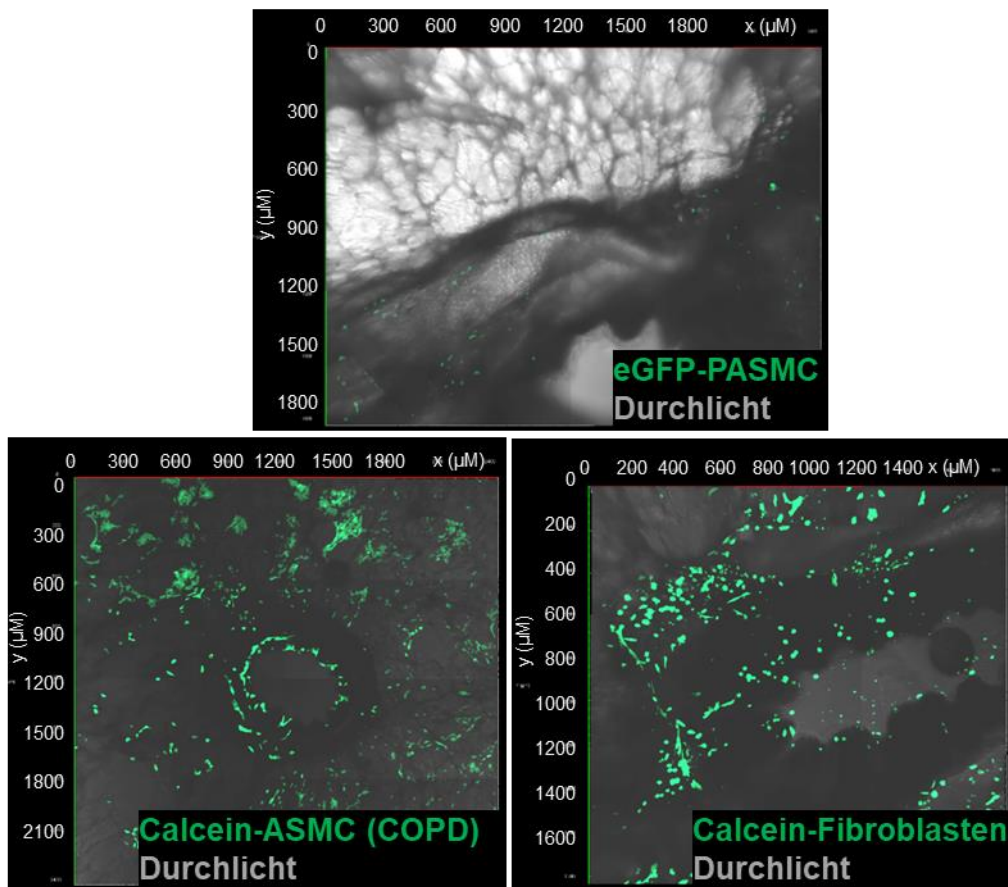


Abbildung 39: Wiederbesiedelte dezellularisierte Gerüste einen Tag nach der Besiedlung. Dezellularisierte Gerüste der Schweinelunge wurden mit immortalen Zellen besiedelt. Pro Schnitt wurden 100000 Zellen ausgesät. Einen Tag später wurden die Schnitte am konfokalen Mikroskop mittels Z-Stack und Tile Scan analysiert. Dafür wurden die vitalen Zellen der ASMC (COPD) Linie 1 und der Fibroblasten Linie vorab mit 4 μM Calcein AM gefärbt. Die Zellen der PASMC Linie 1 waren eGFP markiert. n=1.

Die Besiedlung aller Gerüste nahm über der Zeit zu, wie in Abbildung 40 dargestellt, eine Woche nach der Besiedlung zu sehen ist. Die Morphologie der BSMC, aber auch der PASMC und ASMC (COPD) war spindelförmig und die Zellen wuchsen entlang des Gerüsts. Auch die Fibroblasten waren langgezogen und passten sich der Gerüstform an. Von den BSMC und Fibroblasten wurde das gesamte Gerüst besiedelt, wobei die Zellen entlang des Parenchyms und des gesamten Atemwegs wuchsen. Die PASMC besiedelten ungefähr 50 % der dargestellten Fläche. Sie lagerten sich um ein Blutgefäß, ihr natürliches Habitat, an. Die ASMC (COPD) bewuchsen die Fläche zu ungefähr 30 %. Während die Verteilung der ASMC (COPD) in Abbildung 40 sehr homogen und vereinzelt war, lässt sich nach einer Woche eine Wachstumsrichtung der Zellen und ein Zellverbund erkennen.

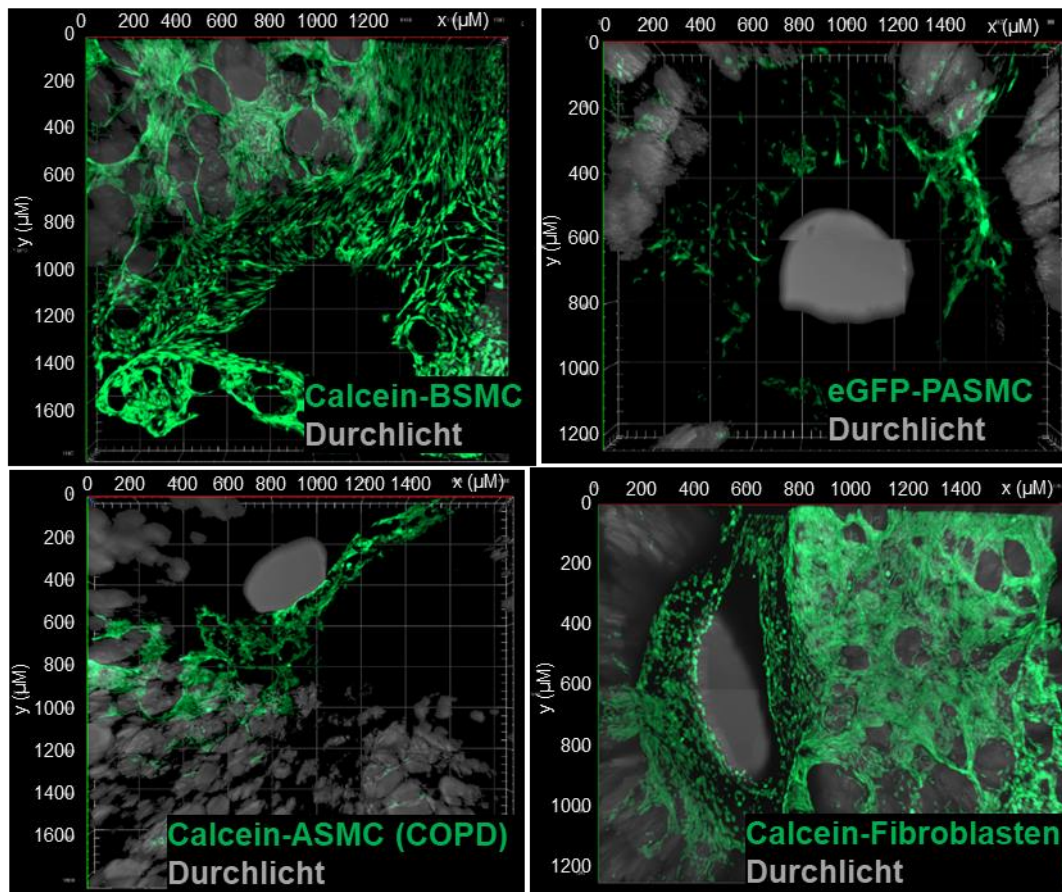


Abbildung 40: Wiederbeseidelte dezellularisierte Gerüste sieben Tage nach der Besiedlung. Die dezellularisierten Gerüste der Schweinelunge wurden mit immortalen Zellen besiedelt und für 1 Woche kultiviert. Jeder Schnitt wurde mit 100000 Zellen besiedelt und nach einer Woche am konfokalen Mikroskop mittels Z-Stack und Tile Scan analysiert. Um die vitalen Zellen betrachten zu können, wurden Zellen der BSMC Linie 1, der ASMC (COPD) Linie 1 und der Fibroblasten Linie direkt vor der Mikroskopie mit 4 μM Calcein AM gefärbt. Die Zellen der PASMC Linie 1 waren eGFP markiert. n=1-2.

Nach der erfolgreichen Besiedlung konnte nun in nächsten Versuchen die Kontraktionen der Zellen auf den Gerüsten beobachtet werden. Dafür wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Histamin, Methacholin oder Serotonin stimuliert und über fünf Minuten analysiert. So sind in Abbildung 41 A die Aufnahmen zu den Zeitpunkten 0 s und 300 s abgebildet. Während dieser Zeit wurde alle 10 Sekunden ein Foto aufgenommen. Da es so sehr schwer ist Unterschiede in der Atemwegsgröße festzustellen, wurden die Daten mit der Software ImageJ ausgewertet. Dafür wurde anhand der Threshold-Funktion ein Schwellenwert festgelegt und die Region of Interest (ROI) definiert, in der die Pixeländerung über die Zeit analysiert wurde (Abbildung 41 B). Danach wurde mit ImageJ die Veränderung der roten Pixel in der ausgewählten ROI berechnet. Die Daten können anschließend mit Hilfe von Excel graphisch dargestellt werden (Abbildung 41 C). In Abbildung 41 ist zunächst der Atemweg eines mit BSMC besiedelten Schnitts zu sehen. Dieser wurde mit 1 μM Histamin

stimuliert. Die Funktionalität der BSMC im Zusammenhang mit Histamin wird deutlich, da sich die Ausgangsfläche durch die Kontraktion der Zellen um 8 % verkleinert hat (Abbildung 41 C).

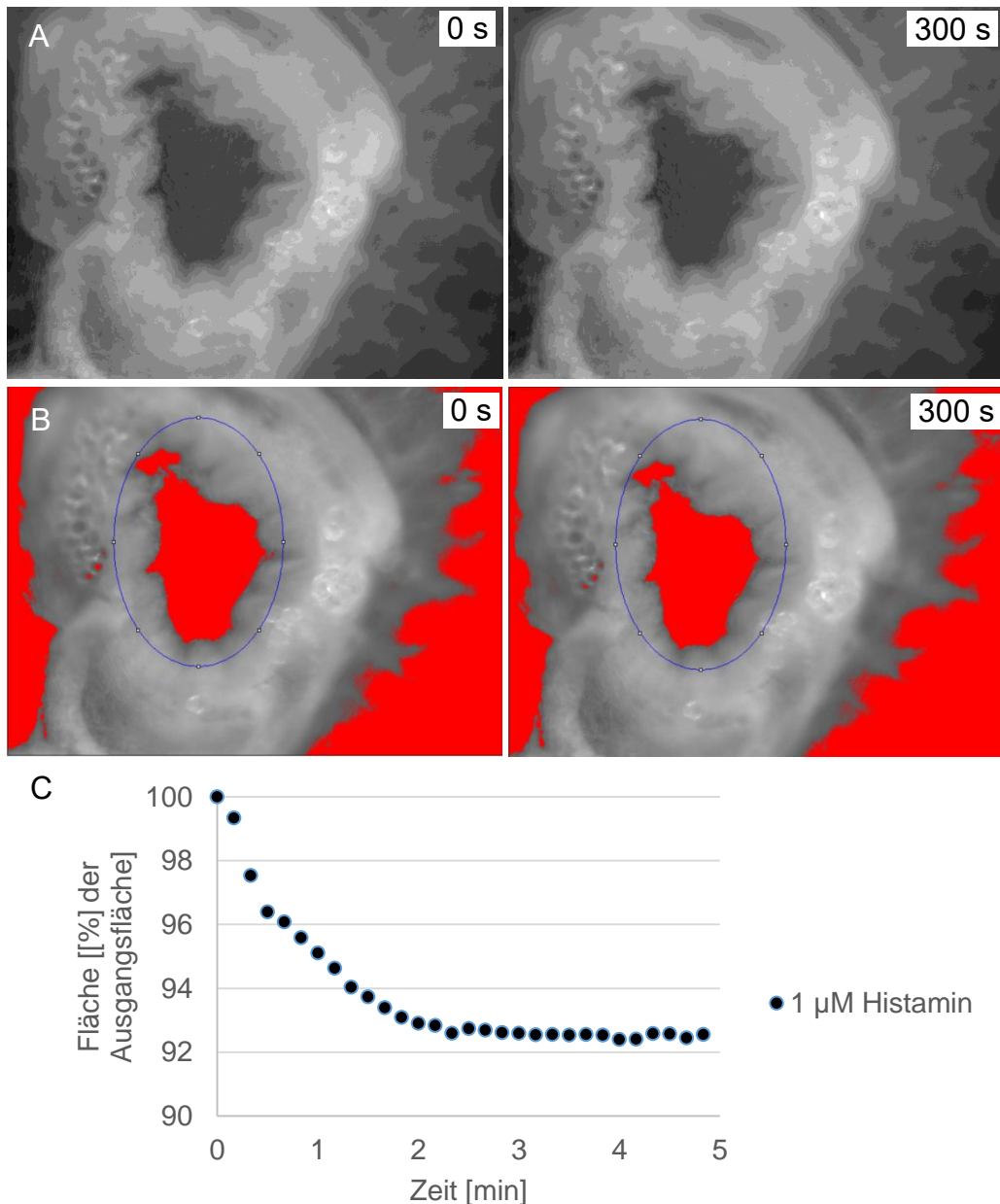


Abbildung 41: Messung der Kontraktion von rezellularisierten Atemwegsschnitten nach Histaminstimulation. Nach der Dezellularisierung der porcinen Atemwegsschnitte wurden diese mit Zellen der BSMC Linie 1 wiederbesiedelt und für fünf Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen unter einem Durchlichtmikroskop mit 1 µM Histamin stimuliert. Hierbei wurde der Fokus auf den Bereich des Bronchus gelegt. Alle 10 Sekunden wurde eine Aufnahme gemacht. Die Histaminzugabe erfolgte nach 60 s. Der Mittelwert der ersten 60 s wurde ermittelt und als ein Datenpunkt dargestellt. Abbildung A zeigt die Durchlichtaufnahmen nach 0 sowie 300 Sekunden. B) spiegelt die Auswertung der Kontraktion mittels ImageJ wieder. Zunächst wurde ein Threshold gesetzt und so die gesamte Atemwegsfläche zum Zeitpunkt 0 s rot gefärbt. Des Weiteren wurde die zu analysierende Atemwegsfläche (ROI - Region of Interest) kreisförmig eingegrenzt. Der Kreis ist identisch in der 0 s sowie in der 300 s Aufnahme. Nun wird im Kreis mittels der Software die Pixelveränderung der roten Fläche über die Zeit ausgewertet. Die Daten wurden mit Excel graphisch dargestellt (C). Repräsentative Darstellung der Atemwegskontraktion. n=2.

Da sich die Zellen nicht nur im Atemwegsbereich, sondern auf dem gesamten Gerüst ansiedelten, wurde zusätzlich die Kontraktion in Kombination mit dem Parenchym untersucht (Abbildung 42). Die Daten bestätigen die Daten des Calcium Assay, da deutlich wurde, dass die BSMC nach Stimulation mit 1 μM Histamin das gesamte Gerüst zusammenzogen. In Abbildung 42 A ist dabei die Größe der Ausgangsfläche (0 s) im Vergleich zur verkleinerten Fläche nach der Kontraktion (300 s) zu sehen. Um den Unterschied deutlich zu machen, wurde die gelbe Linie eingefügt und der reduzierte Bereich in Abbildung 42 B ausschraffiert. Um die Kontraktion graphisch auszuwerten, wurde wie bereits beschrieben mit Hilfe von ImageJ die Flächenänderung in Pixel bestimmt und diese mit Excel dargestellt (Abbildung 42 C). Die Daten zeigen, dass es durch die Kontraktion zu einer Flächenänderung von ungefähr 10 % kam.

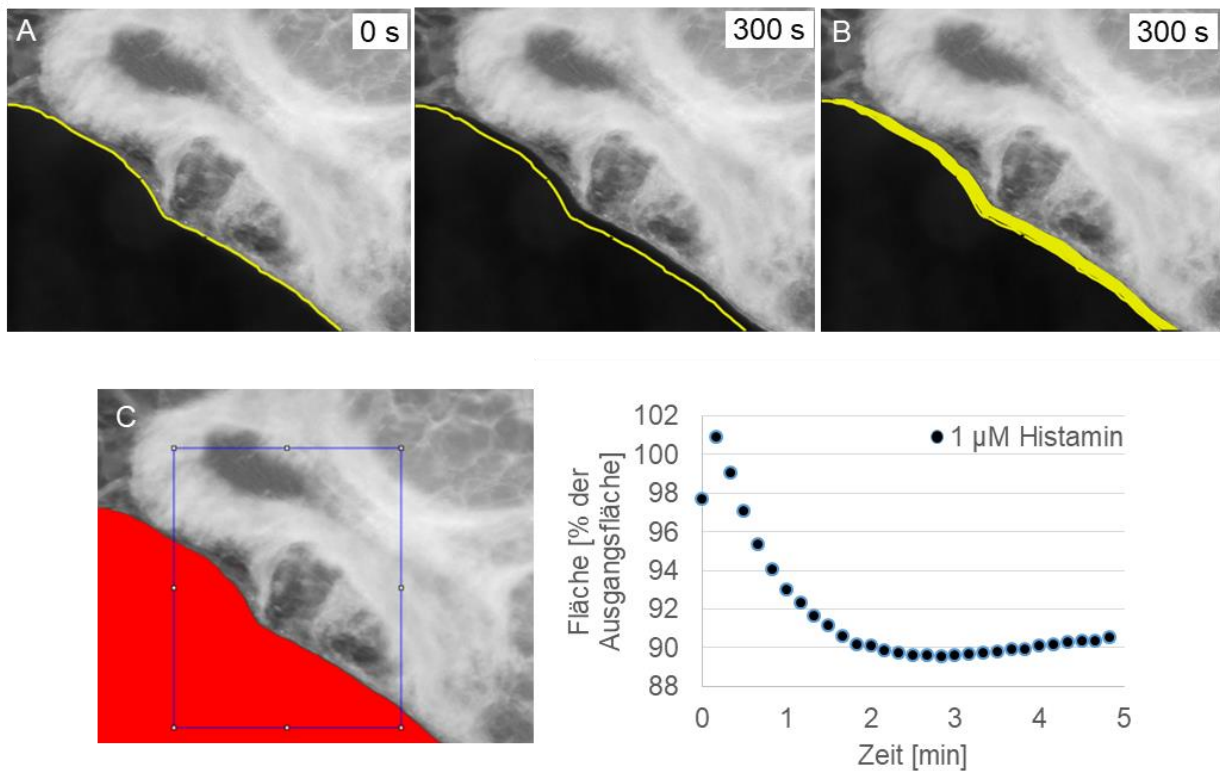


Abbildung 42: Kontraktionsmessung rezellularisierter Atemwegsschnitte nach Histaminstimulation. Dezellularisierte porcine Atemwegsschnitte wurden mit Zellen der BSMC Linie 1 wiederbesiedelt und für fünf Tage kultiviert. Danach wurden die Zellen unter einem Durchlichtmikroskop mit 1 μM Histamin stimuliert. Im Abstand von jeweils 10 Sekunden wurden Aufnahmen gemacht. Die Histaminzugabe erfolgte nach 60 s. Die Daten der ersten 60 s wurden als Mittelwert in einem Datenpunkt zusammengefasst. Abbildung A zeigt die Durchlichtaufnahmen nach 0 sowie 300 Sekunden. Die gelbe Linie soll den Unterschied zwischen dem Pre- und Poststimulations-Zustand verdeutlichen. Der Fläche, um die sich die Ausgangsfläche verkleinert hat, ist in B) schraffiert dargestellt. C) zeigt die Auswertung der Kontraktion mit ImageJ. Dafür wurde der zu analysierende Bereich anhand der Threshold-Funktion von der umgebenden Fläche farblich abgegrenzt. Anschließend wurde die ROI durch ein Rechteck abgegrenzt. Dieser Bereich ist in allen Aufnahmen identisch. Mit ImageJ wurde nun die Veränderung der beiden Flächen analysiert. Abschließend wurden die Daten mit Excel graphisch dargestellt (C). Repräsentative Darstellung der Änderung der Gerüstfläche. n=2.

Als Kontrolle wurden Fibroblasten getestet, da sie ebenfalls Histaminrezeptoren exprimierten. Hier war trotz kompletter Besiedlung des Gerüsts keine Kontraktion nach Stimulation sichtbar (Abbildung 43). Da alle Agonisten in PBS gelöst waren, wurde auch die Zugabe von PBS zum besiedelten Gerüst untersucht. Dabei wurde zu Beginn der Messung ein kleiner Abfall um 2 % in der Fläche detektiert, der sich dann aber wieder ausgeglichen hat.

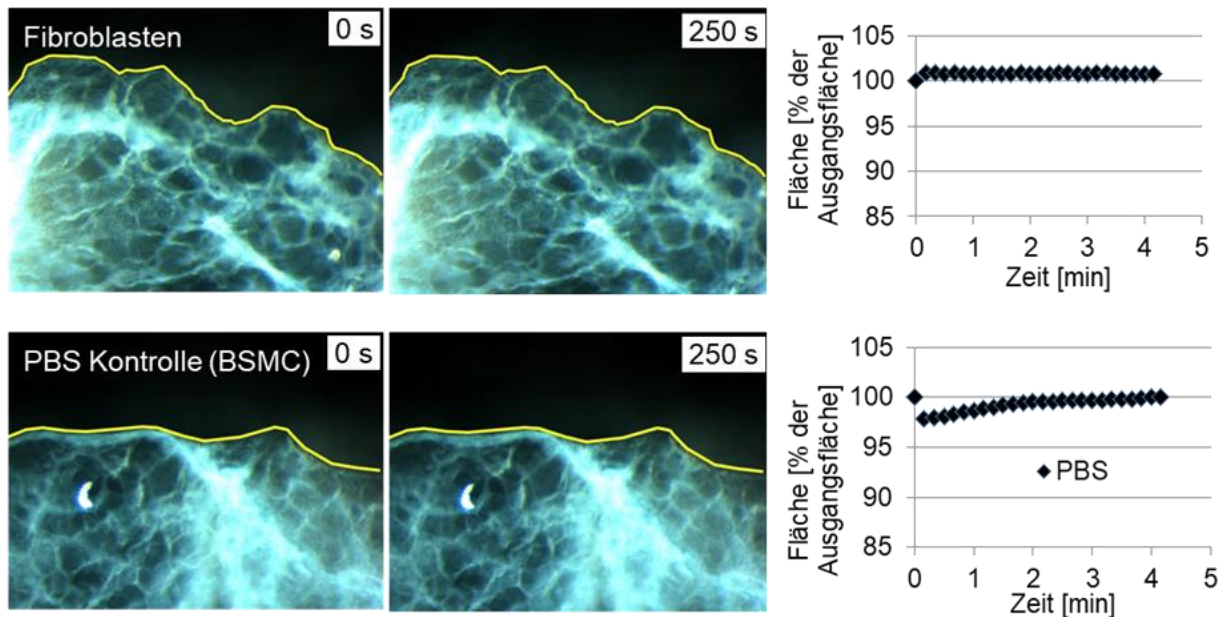


Abbildung 43: Stimulation besiedelter Kontroll-Gerüste mit 1 μ M Histamin. Dezellularisierte Gerüste einer Schweinelunge wurden mit Fibroblasten und BSMC der Linie 1 (PBS Kontrolle) besiedelt und nach einer Woche mit 1 μ M Histamin oder PBS stimuliert. Dargestellt sind die Durchlichtmikroskopaufnahmen zu Beginn der Messung (0 s) sowie nach 250 s. Die Aufnahmen wurden mittels ImageJ und Excel ausgewertet und graphisch dargestellt. Repräsentative Darstellung eines von 1-2 besiedelten Schnitten.

Neben BSMC kontrahierten auch die PASMC auf dem dezellularisierten Lungengerüst nach Zugabe von 1 μ M Histamin. Hier war eine Verringerung in der Fläche um 10 % zu beobachten (Abbildung 44). ASMC des COPD Spenders zeigten trotz der Expression von Histaminrezeptoren keine Kontraktion nach Histaminstimulation.

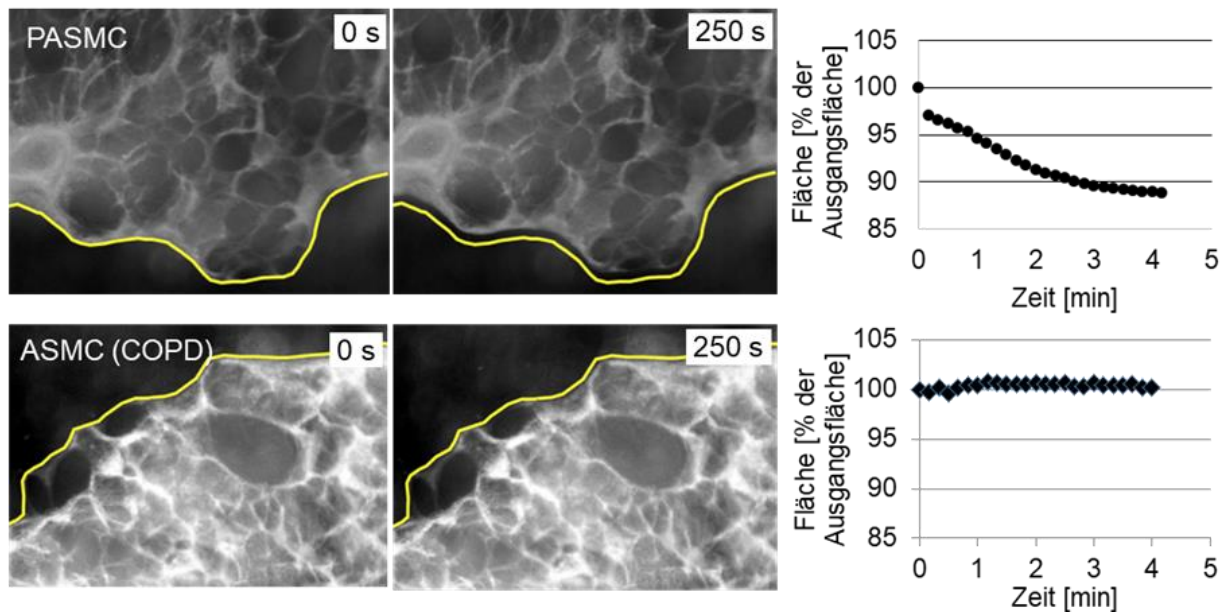


Abbildung 44: Stimulation besiedelter Gerüste mit 1 µM Histamin. Dezellularisierte Gerüste einer Schweinelunge wurden mit Zellen der PASC Linie 1 und ASMC (COPD) Linie 1 besiedelt. Nach einer Woche wurde die Kontraktion der Zellen als Antwort auf 1 µM Histamin untersucht. Abgebildet sind die Durchlichtmikroskopaufnahmen zu Beginn der Messung (0 s) sowie nach 250 s. Die Aufnahmen wurden mittels ImageJ und Excel ausgewertet und graphisch abgebildet. Repräsentative Darstellung eines von 3 besiedelten Schnitten.

Die PASCs wurden außerdem mit verschiedenen Serotonin-Konzentrationen stimuliert (Abbildung 45 A). Dafür wurden die besiedelten Schnitte unter dem Mikroskop über eine Gesamtzeit von 18 Minuten stimuliert. Alle drei Minuten wurde die Serotoninkonzentration erhöht: angefangen bei 0,1 µM Serotonin bis 100 µM Serotonin. Dabei wurde eine Verringerung der Schnittfläche pro Konzentration um ungefähr 2 % beobachtet. Insgesamt verkleinerte sich die Fläche um 10 %. Als Kontrolle wurden Fibroblasten-besiedelte Gerüste mitgetestet. Sie zeigten insgesamt eine Reduktion der Fläche um 3 %.

Anschließend wurden ASMC (COPD) mit verschiedenen Konzentrationen von Methacholin stimuliert (Abbildung 45 B). Angefangen bei 0,1 µM Methacholin bis zu einer Konzentration von 100 µM. Die Fläche verringerte sich insgesamt um 7 %. Die stärkste Flächenabnahme war bei 10 µM Methacholin zu beobachten. Als Kontrolle wurden auch hier besiedelte Fibroblasten-Gerüste mitstimuliert. Sie zeigten unabhängig der Methacholinkonzentration und trotz Expression von Methacholinrezeptoren keine Änderung in der Gerüst-Fläche.

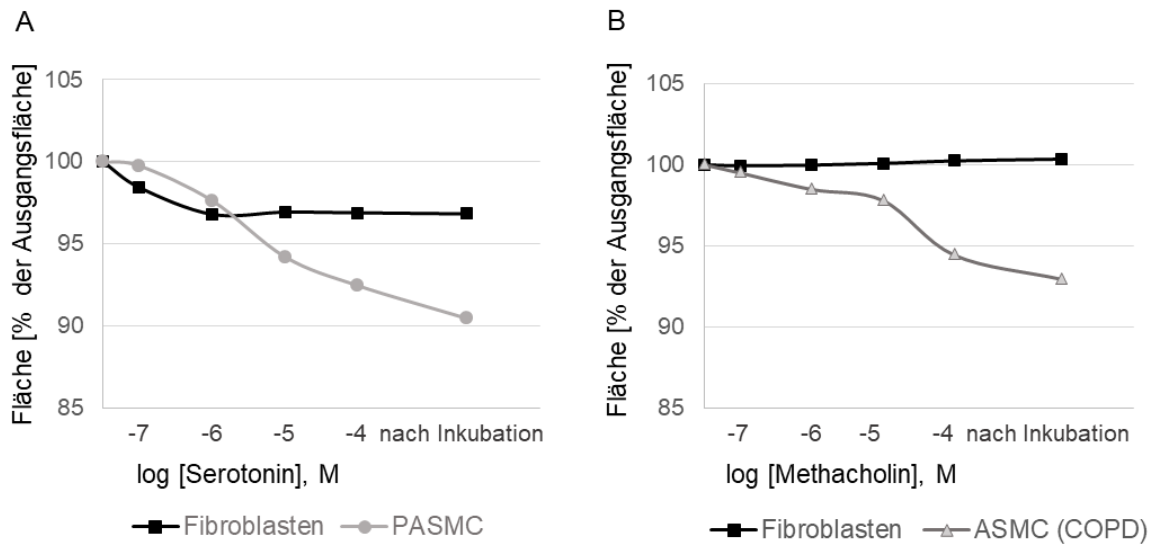


Abbildung 45: Dosis-Wirkungskurven für Serotonin und Methacholin. Zellen der PASM Linie 1, der ASMC (COPD) Linie 1 sowie die Fibroblasten wurden auf dezellularisierte Gerüste einer Schweinelunge gesät und für eine Woche kultiviert. Danach wurden die PASM mit verschiedenen Serotoninkonzentrationen (0,1 μ M-100 μ M) unter dem Durchlichtmikroskop stimuliert. Die gesamte Stimulationszeit betrug 18 Minuten, wobei alle drei Minuten die Konzentration erhöht wurde. Auf die gleiche Weise wurden auch die ASMC des COPD Spender mit verschiedenen Methacholinkonzentrationen stimuliert (B). Als Kontrollen wurden besiedelte Fibroblasten-Gerüste verwendet. Die Daten der Durchlichtmikroskopie wurden mittels ImageJ und Excel ausgewertet und graphisch abgebildet. n=1.

Um herauszufinden, ob mit Hilfe des Stimulierungsmediums die Stärke der Kontraktion noch gesteigert werden kann, wurden BSMC nach einer Kultivierung von fünf Tagen auf dem Lungengerüst zusätzlich für zwei Tage stimuliert (Abbildung 46). Dabei war zu beobachten, dass sich auf dem gesamten Gerüst Zellaggregate formten (siehe gelbe Pfeile). Nach Stimulation dieser Gerüste mit 1 μ M Histamin war keine Kontraktion mehr zu beobachten.

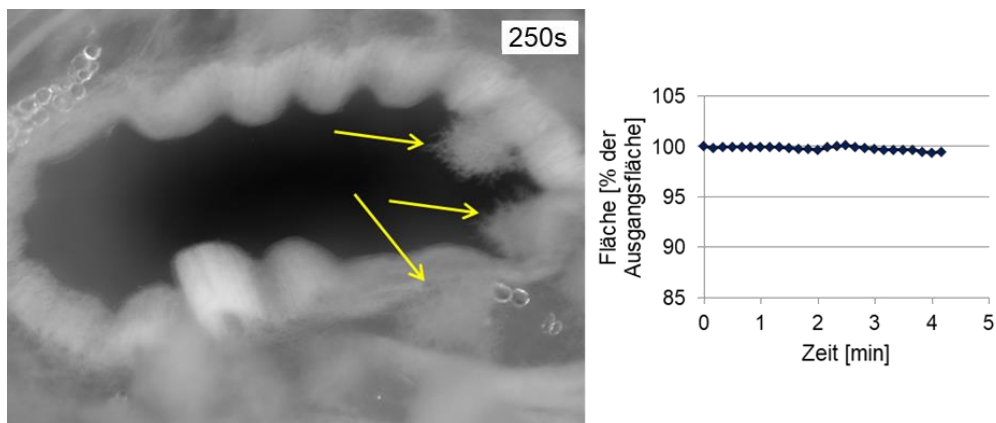


Abbildung 46: Stimulierung der BSMC auf dem Lungengerüst. BSMC-besiedelte Lungengerüste wurden für fünf Tage im Glattmuskelmedium kultiviert bevor sie zusätzlich für zwei Tage im Stimulierungsmedium (Ham's F12/DMEM (1:1), 1 % FBS, 5 ng/ml TGF- β 1 und 0,7 % B27) kultiviert wurden. Anschließend wurden sie mit 1 μ M Histamin behandelt und am Durchlichtmikroskop analysiert. Die Aufnahmen wurden mittels ImageJ und Excel ausgewertet und graphisch dargestellt. n=1.

3.3.5 Sprouting von immortalen PASMC in Kokultur mit Endothelzellen

Ein zusätzlicher Test, der Auskunft über die Funktionalität der Glattmuskelzelllinien der Pulmonalarterie gibt, ist die Gefäßbildung im Zusammenhang mit Endothelzellen. Dies wurde mit einem Sprouting Assay überprüft. Der Sphäroid-basierte Sprouting Assay wurde Ende der 90er Jahre entwickelt und ermöglicht die Analyse der Gefäßbildung durch Auswachsen beziehungsweise Sprießen von Zellröhren/Gefäßstrukturen in einer 3D-Umgebung (Korff 2004; Blacher et al. 2014; Tuz Zahra et al. 2019). Dafür werden zunächst 3D-Sphäroide geformt, die dann in eine Matrix eingebettet und mikroskopisch über die Zeit analysiert werden können. Für den Ansatz wurde zunächst überprüft, ob PASMC im Endothelzellmedium kultiviert werden können und so ein Kokulturmodell etabliert werden kann (Abbildung 47). PASMC wurden entweder nur im Endothelzellmedium (EC Medium) oder in einer Mischung aus Endothelzellmedium und Glattmuskelzellkulturmedium (SMC Medium) kultiviert. Als Kontrolle diente die Kultivierung im SMC Medium. Nach 10 Tagen Kultivierung in den jeweiligen Medien konnte kein morphologischer Unterschied zwischen Zellen im SMC Medium und den Zellen im gemischten Medium (EC Medium und SMC Medium (1:1)) festgestellt werden. Dagegen zeigten Zellen, die ausschließlich im Endothelzellmedium gezüchtet wurden eine heterogene Morphologie, wobei neben Zellen mit der ursprünglichen Morphologie auch langgezogene, spindelförmige Zellen identifiziert werden konnten.

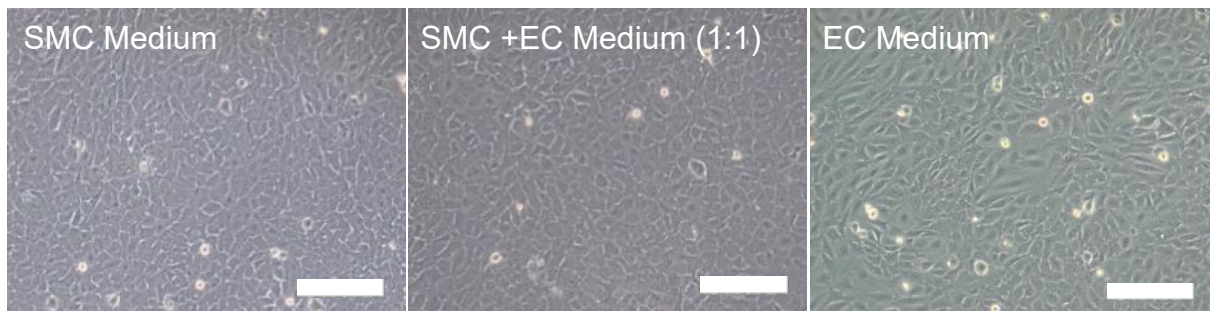


Abbildung 47: Mediumtest für Kokultivierung von PASMC und EC. PASMC der Linie 1 in p41 wurden im Glattmuskelzellkulturmedium (SMC Medium) ausgesät. Einen Tag später wurden die Zellen mit PBS gewaschen und auf die verschiedenen Medien umgestellt. Dafür wurde ein Mischmedium aus Endothelzellmedium (EC Medium) und SMC Medium verwendet (Mischungsverhältnis 1:1) sowie nur das EC Medium. Nach 10 Tagen wurden die Zellen am Durchlichtmikroskop morphologisch analysiert. Messbalken 200 µm. n=1.

Zusätzlich wurden auch HuVECs, die für den Versuch verwendet werden sollten, im reinen Glattmuskelzellmedium sowie auch im 1:1 gemischten Medium aus EC Medium und SMC Medium kultiviert (Abbildung 48). Für gewöhnlich werden die Endothelzellen auf einer Gelatine-Beschichtung gezüchtet. Daher wurde auch getestet, ob die Zellen ohne Beschichtung anwachsen und kultivierbar sind. Dabei ist zu beobachten, dass die Zellen auf dem beschichteten Untergrund größer und die Wells dicht besiedelter waren als auf den unbeschichteten Wells. Des Weiteren ist festzustellen, dass Endothelzellen nicht im Glattmuskelzellmedium gezüchtet werden konnten. Ohne Beschichtung starben fast alle Zellen nach 6 Tagen Kultivierung ab. Auch mit der Gelatine-Beschichtung waren deutlich weniger Zellen angeheftet als im Endothelzellmedium. Bei Kultivierung auf beschichtetem Untergrund im gemischten Medium, bestehend aus EC und SMC Medium (1:1), zeigten die Zellen nach sechs Tagen eine vergleichbare Morphologie wie im EC Medium, allerdings war der Zellrasen weniger konfluent. Ohne Beschichtung im gemischten Medium war eine deutliche Reduktion der Zellzahl zu erkennen. Auch war eine starke Änderung der Morphologie zu beobachten. Die Zellen zeigten Kopfsteinpflaster-ähnliche Formen. Da für den Sprouting-Assay nur eine Kurzzeitkultivierung der Zellen im veränderten Medium nötig ist, wurde für die Kokultivierung von Endothelzellen (EC) und PASMC eine 1:1 Mischung aus dem SMC Medium und dem Endothelzellmedium verwendet.

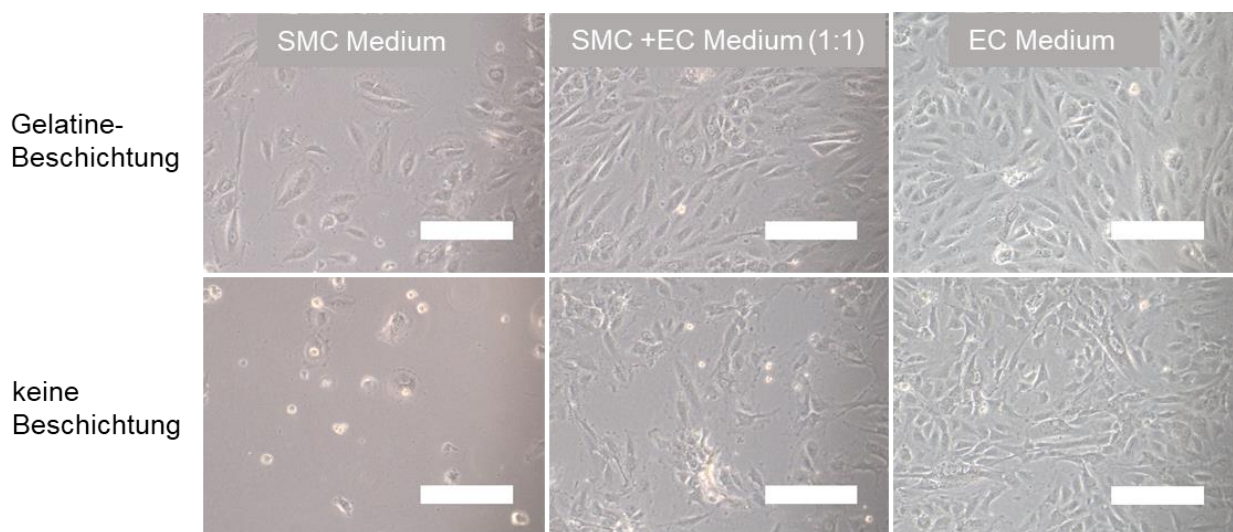


Abbildung 48: Mediumtest der Endothelzellen zur Feststellung des Kokulturmediums. HuVEC p27 wurden im Endothelzellkulturmedium (EC Medium) ausgesät. Zwei Tage später wurden die Zellen mit PBS gewaschen und auf die verschiedenen Medien umgestellt. Dafür wurde ein Medium, bestehend aus Endothelzellmedium (EC Medium) und SMC Medium verwendet (Mischungsverhältnis 1:1) sowie nur das SMC Medium. Nach sechs Tagen in Kultur wurden die Zellen am Durchlichtmikroskop morphologisch analysiert. Messbalken 200 μm . n=1.

Die Kokultivierung von PASM C und EC erfolgte auf Agarose-beschichteten 96-Well Platten. Die Beschichtung verhindert das Anheften der Zellen am Kulturgefäßboden, sodass sich die Zellen zu 3D-Aggregaten zusammenlagern. Oft wird in der Literatur ein Verhältnis zwischen eingesetzten SMC und EC von 4:1- 6:1 verwendet (Lin et. al. 2012; Ning et al. 2013; Scott et al. 2017). Da aber die immortalen PASM C deutlich schneller proliferierten als die EC, wurde das Verhältnis zu Gunsten der EC erhöht. Pro Sphäroid wurden 1500 Zellen ausgesät. Dabei wurde ein Verhältnis für Endothel zu PASM C von 10:1 ausgewählt (150 PASM C und 1350 Endothelzellen pro Sphäroid). Die verwendeten Endothelzellen wurden vorher RFP markiert und die PASM C mit eGFP markiert, um die beiden Zelltypen voneinander mittels Fluoreszenzmikroskopie unterscheiden zu können. In Abbildung 49 A ist die Sphäroidbildung nach 48 h zu sehen. Dabei lässt sich erkennen, dass PASM C sowie EC in Monokultur bereits Sphäroide ausbildeten. Sphäroide, die sich nur aus PASM C zusammensetzten, zeigten eine abgegrenzte Umrandung im Vergleich zu den Sphäroiden, die nur aus EC bestanden. Diese war bei den EC-3D-Aggregaten eher ausgefranst. 3D-Aggregate, die sich aus beiden Zelltypen gebildet haben, zeigten eine leicht ausgefranste Umrandung und eine kompakte Grundform. Die Sphäroide wurden für den Sprouting-Test in ein Kollagengel eingebettet und erneut nach 24 h mikroskopisch analysiert (Abbildung 49 B). Anhand der Durchlichtaufnahmen war ein Auswachsen der Zellen aus den Sphäroiden der Kokultur zu sehen. Die ausgewachsenen Zellen waren eng miteinander verbunden und deuteten auf zusammenhängende Verästelungen beziehungsweise Gefäßstrukturen hin. Dabei war auch zu erkennen, dass sich die immortalen PASM C (eGFP) überwiegend im Zentrum des Aggregats ansiedelten und die Verästelungen nach außen unterstützten. Die immortalen EC (RFP) waren auch teilweise im Zentrum angelagert, aber gaben die Richtung für die Gefäßbildung vor und wuchsen dahin aus. Bei EC-3D-Aggregaten wuchsen die Zellen aus dem Zentrum aus, aber weniger als zusammenhängende Kanäle sondern vielmehr als einzelne, nicht miteinander verbundene Zellen. Die Zellen der PASM C-Sphäroide waren weiter stark miteinander verbunden und expandierten nach außen in das Kollagengel.

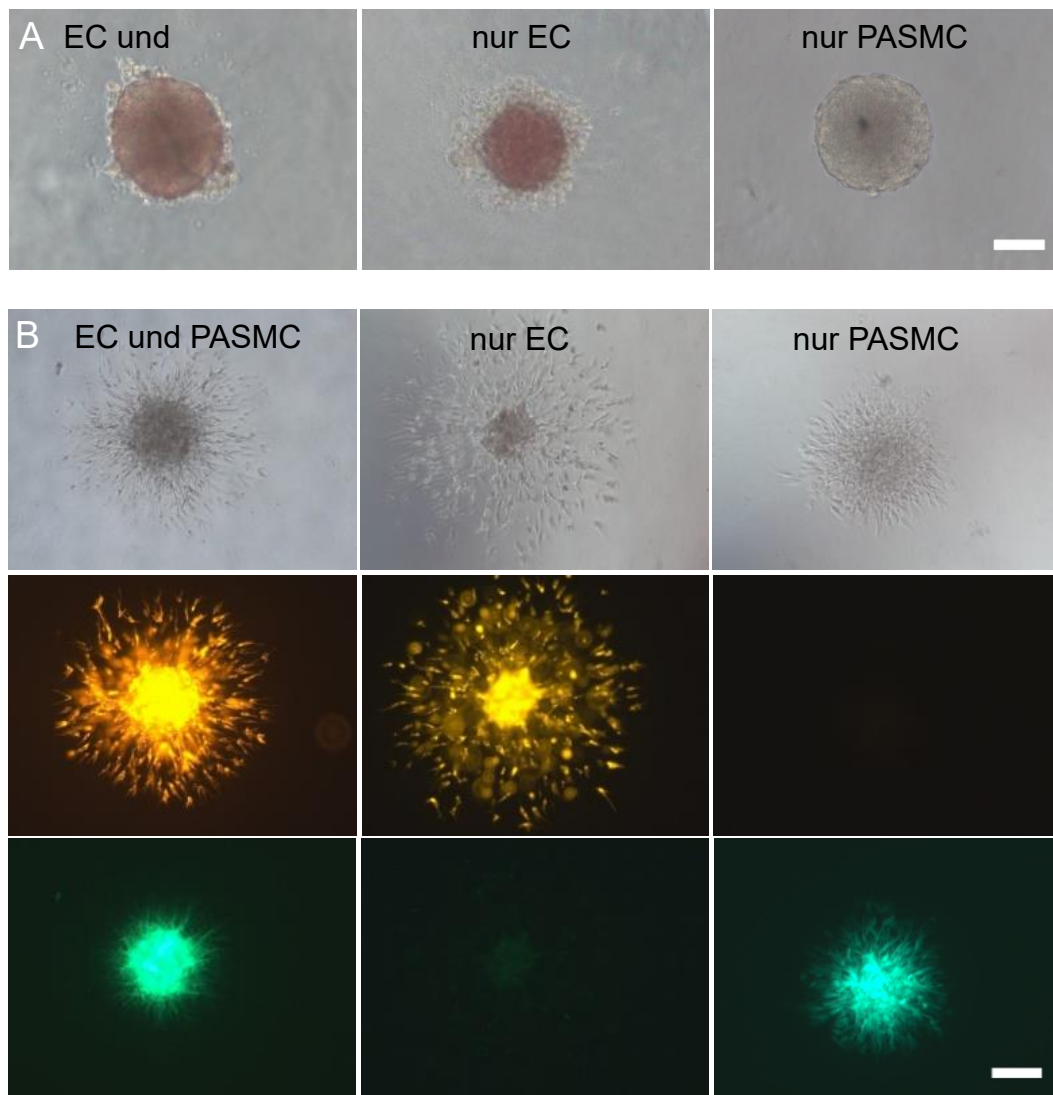


Abbildung 49: Sprouting-Test von immortalen PASMC und EC. Um das Sprouting der Zellen zu untersuchen, wurden PASMC der Linie 1 (eGFP markiert) und HuVEC (RFP markiert) in Mono- oder Kokultur auf Agarose-beschichteten 96-Well Platten ausgesät und für 48 h kultiviert. Pro Sphäroid wurden 1500 Zellen ausgesät. In der Kokultur wurden die Endothelzellen (EC) und PASMC im Verhältnis von 10:1 zueinander ausgesät. A) Durchlichtmikroskopische Aufnahmen der entstandenen 3D-Aggregate nach 48h. Messbalken 100 μ m. B) Die Sphäroide wurden anschließend im Kollagengel eingebettet und das Sprouting 24 h nach Einbettung mittels Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Messbalken 200 μ m. n=1.

3.4 Anwendung der generierten Glattmuskelzelllinien

Glattmuskelzellen sind in einer Vielzahl von Krankheiten involviert. Darunter zählen unter anderem Asthma, COPD und Bluthochdruck (Berair, Hollins und Brightling 2013; Severi et al. 2014; Zhang et al. 2015; Lam, Lamanna und Bourke 2019). Um neue effiziente Medikamente gegen diese Erkrankungen herzustellen, werden die Wirkstoffkandidaten oft im Hochdurchsatzverfahren auf ihre Wirksamkeit getestet. Ein Test der dabei oft verwendet

wird, ist der bereits beschriebene Fluo-4 Calcium Test (Liu 2018). Auslöser für Asthma sind beispielsweise Allergien wie etwa gegen Pollen oder Hausstaubmilben (Mims, 2015). Auch die Symptome von COPD Erkrankten sind bei Allergikern stärker ausgeprägt. Im Falle einer allergischen Reaktion kann es unter anderem zur Ausschüttung von Histamin kommen (Simon, 2018). Histamin wird hauptsächlich in den Mastzellen produziert und steuert regulatorische Prozesse wie beispielsweise Entzündungsreaktionen und die Kontraktion der Bronchien (Huang et al. 2018; Thangam et al. 2018; Yamauchi und Ogasawara 2019). Um die Wirkung des körpereigenen Botenstoffs zu inhibieren und damit die Allergie zu unterdrücken, werden H1-Antihistaminika verwendet (Simon, 2018). Diese Wirkstoffe hemmen den Histamin 1-Rezeptor. Der Wirkstoff, der im folgenden Versuch getestet wurde, ist das H1-Antihistaminikum Levocetirizin (Snidvongs, Seresirikachorn, Khattiyawittayakun, & Chitsuthipakorn, 2017). Hierbei handelt es sich um ein Enantiomer des Cetirizins, das antiallergische und entzündungshemmende Eigenschaften besitzt (Fitzsimons et al., 2015). Um die Wirksamkeit von Levocetirizin an den generierten Glattmuskelzelllinien testen zu können, wurden diese mit dem Calciumindikator Fluo-4 beladen und zeitgleich mit verschiedenen Konzentrationen von Levocetirizin (0,1-10 μM) vorstimuliert. Danach wurden die Zellen am konfokalen Mikroskop mit 10 μM Histamin über 90 Sekunden stimuliert (Abbildung 50). Während es ohne die Vorstimulation mit Levocetirizin zu einer zwei- bis dreifachen Erhöhung der Fluoreszenzintensität nach Histaminstimulation kam (Abbildung 28), war die Freisetzung von Calcium nach Histaminrezeptorstimulation bei den generierten BSMC, PASMC und Fibroblastenlinien bei 10 μM Levocetirizin komplett geblockt. Auch geringere Konzentrationen von Levocetirizin (0,1-1 μM) führten zu einer kompletten Inhibition des intrazellulären Ca^{2+} -Einstroms über den Histaminrezeptor. Im Vergleich dazu sind in Abbildung 51 die Inhibitoraten der ASMC Linie des COPD Spenders dargestellt. Auch hier konnte die komplette Inhibierung des Histaminrezeptors bei Verwendung von 1-10 μM Levocetirizin beobachtet werden. Interessant war allerdings, dass bei Reduktion auf 0,1 μM Levocetirizin eine Verdopplung der Fluoreszenzintensität festgestellt wurde. Die ASMC (COPD) reagierten so stark auf Histamin, dass trotz Vorstimulation mit 0,1 μM Levocetirizin auch bei Reduktion der Histaminkonzentration auf 1 μM das Einströmen von Ca^{2+} und damit eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität zu beobachten war. Im Vergleich zu den Daten ohne Vorstimulation mit 0,1 μM Levocetirizin (Abbildung 28) war der Anstieg abgeschwächt mit einer 2-fachen Erhöhung anstelle einer 2,5-3-fachen Erhöhung des Fluoreszenzsignals.

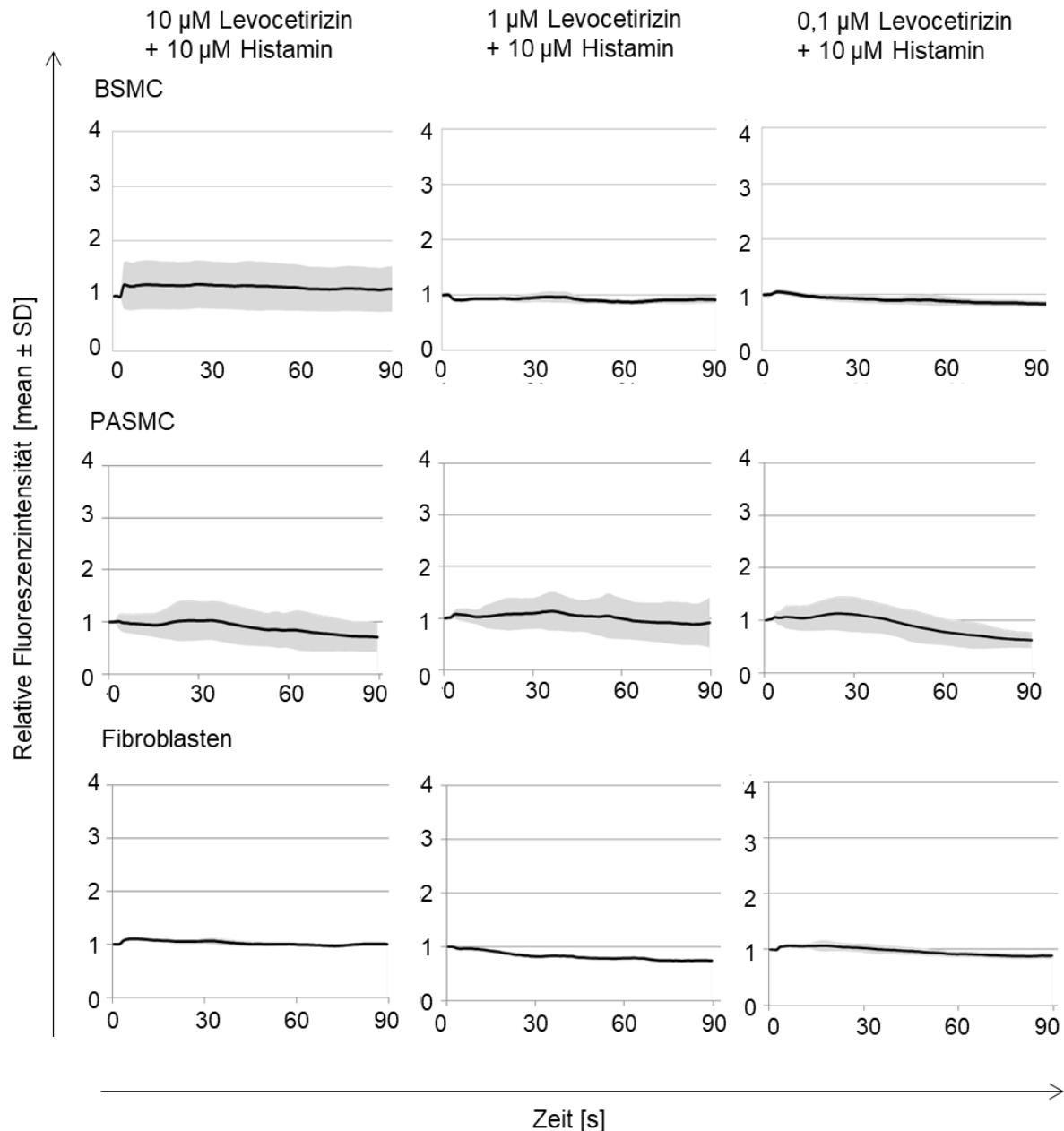


Abbildung 50: Hemmung des Histaminrezeptors durch Levocetirizin führt zur Inhibition des Calciumflux. Zellen der BSMC Linie 1 (p22), der PASM Linie 1 (p37) sowie immortale Fibroblasten (p27) wurden mit dem Calciumindikator Fluo-4 beladen. Parallel wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Levocetirizin (0,1-10 µM) vorstimuliert. Anschließend wurden die Zellen unter dem konfokalen Mikroskop mit 10 µM Histamin stimuliert und über 90 Sekunden beobachtet. Die Daten wurden mittels ImageJ ausgewertet und graphisch durch Excel abgebildet. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus 70-80 Zellen einer Messung \pm Standardabweichung. Abweichend: Mittelwerte und Standardabweichung PASM: n=30-40 Zellen.

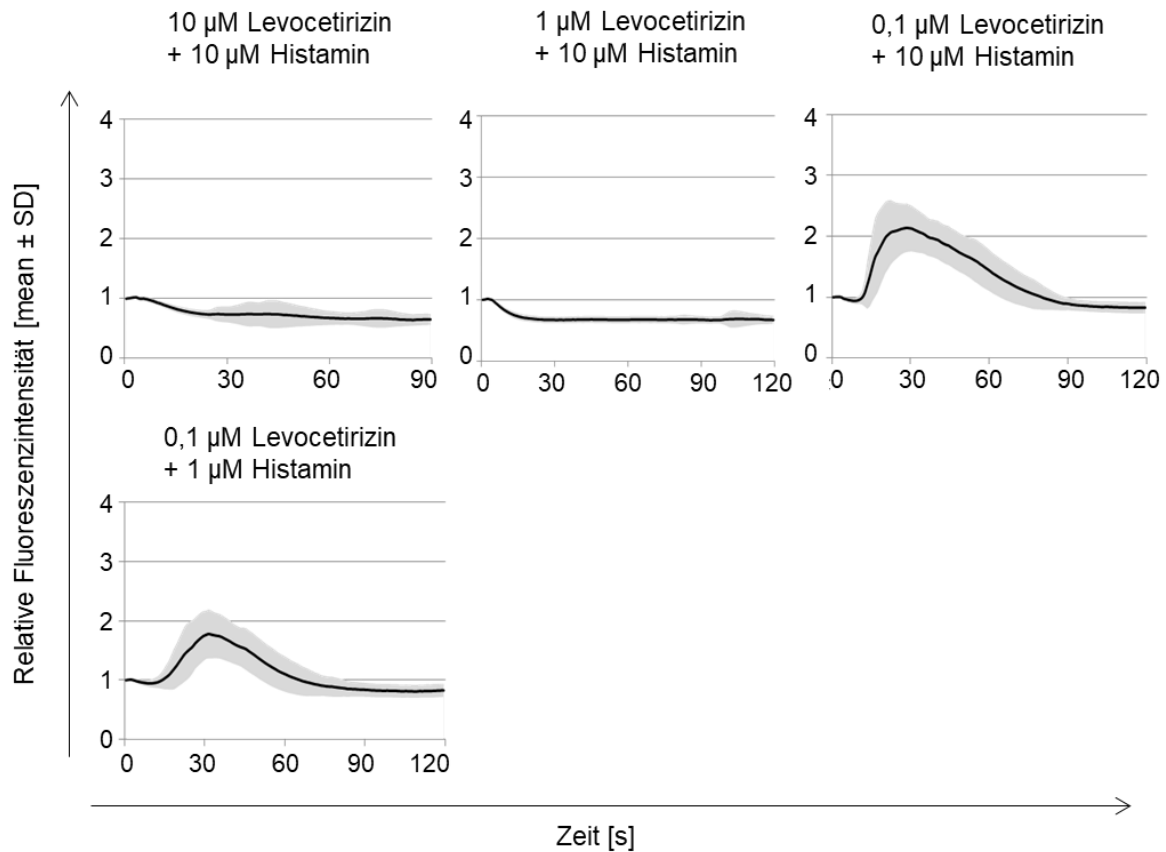


Abbildung 51: Partielle Inhibition des Calciumflux durch Levocetirizin in COPD Zellen. Zellen (p26) der ASMC Linie 1 des COPD Spenders wurden mit dem Calciumindikator Fluo-4 beladen und gleichzeitig mit verschiedenen Levocetirizin-Konzentrationen vorinkubiert. Danach wurden die Zellen am konfokalen Mikroskop mit 1 μM und 10 μM Histamin stimuliert und über 90-120 Sekunden analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe von ImageJ und Excel. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus 60-70 Zellen einer Messung \pm Standardabweichung.

Um die Inhibitoraten aus dem Fluo-4 Assay anhand von Kontraktionsdaten zu bestätigen, wurde in Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer ITEM Zellen der PASMCLinie 1 auf die dezellularisierten Gerüste ausgesät und eine Woche kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Levocetirizin vorinkubiert und unter dem Durchlichtmikroskop mit verschiedenen Histaminkonzentrationen stimuliert. Die Auswertung erfolgte, wie bereits oben beschrieben, mit Hilfe von ImageJ. Die Graphen wurden mit Excel generiert. Abbildung 52 lässt erkennen, dass ohne Vorstimulation mit Levocetirizin, die mit PASMCLinie 1 besiedelten Gerüste durch Kontraktion insgesamt um ungefähr 10 % schrumpften. Durch die Vorstimulation mit 0,1 μM und 1 μM Levocetirizin und damit der Inhibition des Histaminrezeptors fielen die Kontraktionen der Zellen auf den Gerüsten geringer aus, wodurch sich die Ausgangsfläche weniger stark verkleinerte. Somit wurde durch Inhibition der H1-Histaminrezeptoren das Einströmen von Ca^{2+} verhindert und damit die Kontraktionen der Zellen vermindert.

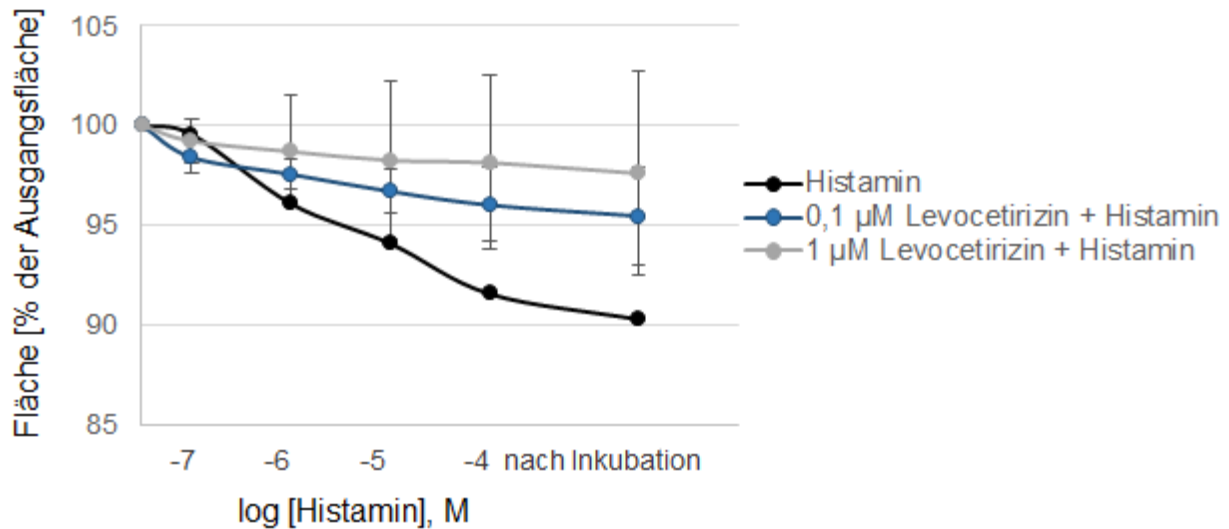


Abbildung 52: Inhibition der Kontraktion rezellularisierter Gerüste durch das Antihistaminikum Levocetirizin. Zellen der PASMCLinie 1 wurden auf dezellularisierte Gerüste einer Schweinelunge gesät und für eine Woche kultiviert. Anschließend wurden die besiedelten Gerüste mit 0,1 und 1 µM Levocetirizin vorstimuliert und unter dem Durchlichtmikroskop mit verschiedenen Histaminkonzentrationen behandelt. Die Messung verlief über 18 Minuten, wobei alle drei Minuten die Histaminkonzentration erhöht wurde (0,1-100 µM Histamin). Die Datenauswertung erfolgte mittels ImageJ und Excel. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung, ermittelt durch die Flächenänderung von jeweils zwei analysierten Schnitten. Abweichend: n=1 für Histaminstimulation ohne vorherige Inhibition.

4. Diskussion

4.1 Immortalisierungsansätze für die Generierung von Glattmuskelzelllinien

Unbegrenzt verfügbare, leicht handhabbare Zellkultursysteme mit physiologisch relevanten Eigenschaften stellen wichtige Werkzeuge für die Forschung, die Herstellung rekombinanter Proteine, die Medikamentenentwicklung und in-vitro Toxizitätstests dar (Allen et al. 2005; Bandaranayake und Almo 2014; Dumont et al. 2016). Auch kann der Einsatz dieser Zellsysteme die Anzahl an Tierversuchen verringern. Zelllinien können durch verschiedene Strategien entstehen. Eine Art der Entstehung ist die spontane Immortalisierung durch Kultivierung (TODARO und GREEN 1963; Diebold et al. 2003). Auf diese Weise ist die vaskuläre Glattmuskelzelllinie A-10 entstanden (Rao, Miano, Olson, & Seidel, 1997). Die Zellen sind aus 14-17 Tage alten embryonalen BDIX Ratten aus der Aorta Thoracica isoliert worden. Die Zellen exprimieren wichtige Markergene wie ACTA2, Calponin und SM22 α . Allerdings zeigen sie eine epitheliale Morphologie und auch die Expression von Genen (Sox10, Sox17, S100 β), die typisch für multipotente vaskuläre Stammzellen (MVSC) sind (Rao et al. 1997; Kennedy et al. 2014). Somit könnte es sich bei Zellen der A10 Linie um von MVSC-abgeleitete SMC oder dedifferenzierte SMC handeln (Kennedy et al., 2014).

Ein anderer Ansatz, um Zellen zu immortalisieren, kann durch die Verwendung viraler Onkogene erzielt werden. Hierbei handelt es sich beispielsweise um das Simian-Virus 40 (SV40) Large-T-Antigen, die adenoviralen Gene E1A und E1B, Onkogene des Epstein-Barr-Virus oder die Gene E6 und E7 des Papillomavirus (Schmitz, 2011). So wurden in Perez-Reyes et al. humane SMC der Aorta durch retrovirale Transduktion mit den E6 /E7 *open reading frames* (ORFs) immortalisiert (Perez-Reyes, Halbert, Smith, Benditt, & McDougall, 1992). Die für die Zellimmortalisierung notwendige starke Expression der viralen Onkogene steht oft in Verbindung mit der Inaktivierung der Tumorsuppressoren p53 und pRB und führt meist zu einem stark veränderten Zellphänotyp. Beispielsweise führt die Expression von E6 zur Aktivierung der Telomerase sowie zum Abbau von p53, während E7 die Wechselwirkung von pRB und dem Transkriptionsfaktor E2F inhibiert und damit Rb inaktiviert (Y. Wang, Chen, Yan, & Pei, 2019). So führte die Immortalisierung in Perez-Reyes et al. zu einer Veränderung der AoSMC Morphologie sowie zur Reduktion des ACTA2-Gehalts (Perez-Reyes et al., 1992). Auch die in dieser Arbeit generierten Glattmuskelzelllinien zeigten zu einem hohen Prozentsatz die Integration der Gene E6 (60 %) und E7 (86,7 %). Diese Gene waren somit essentiell für die Generierung der Glattmuskellinien. Die Expression von E6 war etwas schwächer im Vergleich zu E7. Im Vergleich zu den anderen

Immortalisierungsansätzen war für die hier generierten Glattmuskelzelllinien die Kombination mit noch weiteren immortalisierenden Genen entscheidend.

In Zhou et al. konnten durch die Verwendung einer temperatursensitiven Variante des SV40 Large-T-Antigens die Eigenschaften der primären Zellen mit zeitweiser Proliferation gekoppelt werden (L. Zhou et al., 2004). Zhou et al. zeigte, dass die Proliferation immortalisierter humaner BSMC durch Temperaturänderung kontrolliert werden konnte. Zellen, die bei 33 °C kultiviert wurden, teilten sich kontinuierlich, während Zellen, die bei 39 °C kultiviert wurden, kaum proliferierten (L. Zhou et al., 2004). Die Zellen zeigten die typische spindelförmige SMC-Morphologie, wobei die nicht proliferierenden Zellen in der Größe zunahmten. Auch war die Genexpression kontraktile Proteine wie ACTA2 und SM22 α dieser Zellen erhöht im Vergleich zur Kultur bei 33 °C (L. Zhou et al., 2004).

Eine weitaus schonendere Möglichkeit Zellen zu expandieren und die primär-ähnlichen Eigenschaften zu erhalten, ist die Immortalisierung primärer Zellen mit der katalytisch aktiven Untereinheit der humanen Telomerase (hTERT) (Schmitz, 2011). Durch die Überinfektion von hTERT wird die Verkürzung der telomeren Enden verhindert und damit die replikative Seneszenz umgangen. In Gosens et al. und Burgess et al. konnte diese Art der Immortalisierung erfolgreich an primären humanen Atemwegsglattmuskelzellen angewandt werden. In Gosens et al. ist das Passagieren der immortalen Zellen über mehr als 60-mal im Verhältnis 4:1 möglich ohne Anzeichen von Seneszenz oder Veränderungen der Morphologie (Gosens et al., 2006). Des Weiteren konnten die phänotypischen Glattmuskeleigenschaften wie die Expression von ACTA2, Calponin und Desmin in den Linien nachgewiesen werden. Die Expression dieser Gene konnte außerdem nach einem sieben-tägigen Serumentzug gesteigert werden (Gosens et al., 2006). In Burgess et al. konnten die hTERT-immortalisierten Zellen für 20 Passagen kultiviert werden, während die primären Zellen im Vergleich dazu spenderabhängig nur 2 beziehungsweise 8 Passagen in Kultur gehalten werden konnten (Burgess et al., 2018). Bezüglich der Zytokin-Sekretion (IL-6, Eotaxin-1) und Wachstumsfaktorproduktion (CTGF) waren die immortalen Zellen den primären Zellen sehr ähnlich. Allerdings unterschieden sie sich in der Produktion extrazellulärer Matrixproteine (Fibronektin und Fibulin-1). Neben gesunden BSMC Linien wurden hier auch Linien eines asthmatischen Spenders generiert. Beim Vergleich der gesunden mit der asthmatischen Linie konnte nach Stimulation mit IL-1 β und TNF- α eine stärkere Sekretion von Eotaxin-1 in der asthmatischen Linie beobachtet werden, was typisch für den asthmatischen Phänotyp ist (Burgess et al., 2018).

Auch die Immortalisierung mit hTERT hat Grenzen, da mit hTERT allein nicht in allen Zelltypen eine Immortalisierung erreicht werden kann (Hahn et al., 1999; Kiyono et al., 1998). Für die Entwicklung einer universell einsetzbaren Immortalisierungstechnologie, die Zellexpansion mit dem Erhalt der physiologischen Eigenschaften koppelt, wurde eine aus 33

Genen bestehende lentivirale Genbibliothek zusammengestellt und in dieser Studie erstmals für die Herstellung von Glattmuskelzelllinien getestet. Die lentivirale Genbibliothek setzt sich aus Genen zusammen, die an verschiedenen Signalwegen der Zelle wie dem Zellzyklus, der Apoptose oder der Zelldifferenzierung beteiligt sind (Lipps et al. 2018). Außerdem beinhaltet sie Onkogene wie TAg, E6, E7 oder Bmi1. Die Anwendung dieser als CI-SCREEN bezeichneten Immortalisierungstechnologie führte bereits zur erfolgreichen Immortalisierung verschiedener Zelltypen aus verschiedenen Organismen (Heiss et al. 2015; Selvakumar et al. 2017; Pérez-Campo et al. 2017; Lipps et al. 2018; Sapich et al. 2018). Diese Studie zeigt, dass mit dieser Technologie auch primäre Glattmuskelzellen erfolgreich immortalisiert werden können. Während Glattmuskellinien der Pulmonalarterie, der Aorta und der Atemwege eines COPD Spenders unlimited kultiviert werden konnten, wurde bei den generierten BSMC-Linien nach ungefähr 30-40 kumulativen Populationsverdopplungen eine Abnahme der Proliferation festgestellt, sodass die Integration der Gene hier nur zu einer Expansion, nicht aber zum unlimiteden Wachstum führten. Dies könnte auch für die mit hTERT- immortalisierten Zellen in Burgess et al. zutreffen, da diese nur über einen Zeitraum von 20 Passagen kultiviert wurden (Burgess et al., 2018). Morphologisch betrachtet zeigten die BSMC Linien wie auch die in den Vergleichsstudien generierten Linien die typische spindelförmige Glattmuskelmorphologie (Zhou et al. 2004; Gosens et al. 2006; Burgess et al. 2018). Die Morphologien der PSMC, AoSMC und ASMC (COPD) waren nach der Immortalisierung stark verändert. Die generierten Zellen zeigten anstatt einer spindelförmigen Form eher eine quaderförmige oder auch epitheliale Morphologie, ähnlich wie sie in Zellen der vaskulären Glattmuskellinie A10 beschrieben wurde (Rao et al., 1997). Auch Perez-Reyes et al. beschrieb die Änderung der Glattmuskelzellmorphologie nach der Immortalisierung mit E6/E7 (Perez-Reyes et al., 1992).

4.1.1 Funktionen und Einflüsse der verschiedenen Immortalisierungsgene auf die Immortalisierung von Glattmuskelzellen

Um mögliche Genkombinationen zur Erstellung von zelltypspezifischen Immortalisierungsprotokollen zu identifizieren, wurden in dieser Studie die Integration und Expression der immortalisierenden Gene untersucht. Die Daten der Genintegration zeigen, dass von 12 eingesetzten immortalisierenden Genen die Gene Bmi1, E7, Nanog, MYC, E6, ID1, ID2, ID3 und Core in die Genome der Zellen integriert wurden. Nicht detektiert wurde die Integration der Gene Rex-1, c-FOS oder TAg. Wie bereits beschrieben, konnten andere Studien zeigen, dass die Immortalisierung mit TAg allein möglich ist (L. Zhou et al., 2004). Das konnten die Ergebnisse dieser Studie nicht bestätigen. Da es sich bei der

Immortalisierung mit Lentiviren um eine zufällige Integration handelt und eine Vielzahl immortalisierender Gene verwendet wurde, ist davon auszugehen, dass sich die Integration der anderen Gene als vorteilhafter für die Immortalisierung erwiesen hat als die Integration von TAg. Rex-1 ist ein Pluripotenzmarker und in undifferenzierter embryonalen Stammzellen vorzufinden (Kim et al. 2011). Bei c-FOS handelt es sich um ein Protoonkogen, das in die Zellteilung und Differenzierung einiger Zellen involviert ist (Piechaczyk & Blanchard, 1994). Bei der Immortalisierung von Glattmuskelzellen wurden beide Marker bisher nicht in der Literatur erwähnt. Nachfolgend werden die Funktionen und die Einflüsse der integrierten Gene Bmi1, Nanog, c-MYC, ID1, ID2 und ID3 auf den Glattmuskelphänotyp beschrieben. Die Auswirkungen der Gene E6 und E7 wurden bereits im vorherigen Abschnitt analysiert.

Bmi1

Die Integration von Bmi1 (*B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1*) wurde in 92,9 % der Zelllinien nachgewiesen. Es ist somit das Gen, was am häufigsten in das Genom der verschiedenen Glattmuskelzelllinien integriert und auch exprimiert wurde und scheint entscheidend für die Immortalisierung von Glattmuskelzellen zu sein. Bmi1 wurde als mit MYC-wechselwirkendes Onkogen identifiziert und gehört zur Polycomp-Gruppe (Bhattacharya, Banerjee Mustafi, Street, Dey, & Dwivedi, 2015). Es ist an zahlreichen Zellprozessen wie der embryonalen Entwicklung, dem Zellzyklus, der replikativen Seneszenz, der DNA Reparatur sowie der Erneuerung von Zellen beteiligt (Cho, Dimri und Dimri 2013). Es wirkt als Repressor der Transkription. Die Überexpression von Bmi1, die oft im Falle verschiedener Krebsarten beobachtet wird, führt zur Verlängerung der Proliferation durch Repression von p16 und p19.

Nanog

Bei dem Homöoboxprotein Nanog handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der der Selbst-Erneuerung von embryonalen Stammzellen sowie dem Erhalt der Pluripotenz dient (Ambady et al., 2010). Die Inaktivierung von Nanog führt zur Zelldifferenzierung, während die Überexpression zur Pluripotenz führt. Die Expression von Nanog wurde in verschiedenen Zelltypen wie zum Beispiel in embryonalen Stammzellen, Keimzellen, Fibroblasten, Herzgewebe und Glattmuskelzellen beschrieben, wodurch angenommen wird, dass geringe Mengen an Nanog für die normalen Funktionen in ausdifferenzierten Zellen notwendig sind (Ambady et al., 2010). Auch in transformierten Tumorzellen (Brustkrebs, Gebärmutterhalskrebs) kann die Expression von Nanog nachgewiesen werden (Lathia und Liu 2017). Interessanterweise konnte in Mistriotis et al. sowie in Shahini et al. gezeigt

werden, dass eine Überexpression von Nanog durch Reaktivierung des TGF- β und ROCK-Signalwegs die Expression von F-Aktin und ACTA2 und damit die Kontraktilität in seneszenten MSC steigert (Mistriotis et al., 2016; Shahini, Mistriotis, Asmani, Zhao, & Andreadis, 2017). Auch frühe MSC-Passagen exprimieren ACTA2, jedoch signifikant geringere Mengen als vaskuläre Glattmuskelzellen (Shahini et al., 2017). In 12 der 15 neu entstandenen Glattmuskellinien konnte die Expression von Nanog nachgewiesen werden. Dies lässt darauf schließen, dass neben Bmi1 auch die Expression von Nanog entscheidend für die erfolgreiche Immortalisierung der Glattmuskellinien ist und darüber hinaus auch einen positiven Einfluss auf den kontraktilen Glattmuskelphänotyp haben könnte.

c-MYC

C-MYC gehört zur MYC Onkogen-Familie. Die Expression dieses Gens ist auf proliferierende Zellen beschränkt (Y. Wang et al., 2019). Es konnte gezeigt werden, dass eine Reihe von Onkogenen, darunter c-MYC, C-FOS und C-MYB, an der Proliferation sowie Migration von vaskulären Glattmuskelzellen nach post-vaskulären Verletzungen beteiligt sind (Sun et al., 1999). Die Unterdrückung der c-MYC Expression führte zu einer bis zu 70 % verminderten Proliferation der Glattmuskelzellen (Sun et al., 1999). Andere frühere Studien konnten bereits an neuronalen Vorläufern und epithelialen Prostatazellen zeigen, dass die Immortalisierung ausschließlich mit c-MYC möglich ist (Bernard, Reid und Bartlett 1989; Gil et al. 2005). Die Expression von c-MYC führt dabei zur Aktivierung der Telomerase und zur Inaktivierung von Zellzyklus-regulierenden Proteinen wie p16 (Gil et al., 2005). Auch die Immortalisierung von c-MYC in Kombination mit E7 wurde bereits erfolgreich für humane Keratinozyten beschrieben (X. Liu, Disbrow, Yuan, Tomaic, & Schlegel, 2007). C-MYC ist einer der Yamanaka Faktoren, der für die Redifferenzierung von Fibroblasten zu iPSC beschrieben wird. Bis auf in den BSMC Linien wurde c-MYC in das Genom fast aller generierten Zelllinien integriert. Das Gen wurde in vielen Linien sehr stark exprimiert (0,1-0,3- fache Expression der Referenzgene) und scheint bedeutend für die Glattmuskelzell-Immortalisierung zu sein. Man könnte vermuten, dass sich durch die Integration von c-MYC die Morphologien der PSMC, AoSMC und ASMC (COPD) von denen der BSMC unterscheiden, aber auch, dass genau die Kombination mit diesem Gen entscheidend für das infinite Zellwachstum ist, was bei den BSMC nicht zu beobachten war.

ID1, ID2 und ID3

ID (*Inhibitors of DNA binding*) - Proteine gehören zur Familie der Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren (Roschger und Cabrele 2017). Bei der Auswertung der generierten

Glattmuskelzelllinien konnte die Integration von ID1 (58,3 %), ID2 (53,3 %) und ID3 (50 %) in den Zellen nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte auch deren Expression bestätigt werden. Interessant war allerdings, dass die ID-Proteine nur für die Immortalisierung der PASC und einer ASC (COPD) Linie eine Rolle spielten. BSMC sowie AoSMC zeigten weder die Integration noch die Expression der Gene ID1-ID3. ID-Proteine sind während der Entwicklung sowie bei Krebserkrankungen wichtig für die Regulierung der Zellproliferation sowie der Zelldifferenzierung. ID-Proteine können Signalwege der Tumorsuppressoren pRb und p53 negativ beeinflussen (Roschger und Cabrele 2017).

4.1.2 Reduktion der Immortalisierungsgene

In Lipps et al. wurde gezeigt, dass HuVEC mit einem reduzierten Pool an immortalisierenden Genen immortalisiert werden können und dass der endotheliale Phänotyp nach der Transduktion erhalten bleibt (Lipps et al. 2018). Ebenfalls wurde in Perez-Reyes et al. gezeigt, dass die Immortalisierung von Glattmuskelzellen der Aorta mit den Onkogenen E6 und E7 möglich ist (Perez-Reyes et al., 1992). Auch wenn es sich bei der Immortalisierung um einen zufälligen Prozess handelt, wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, glattmuskelzellspezifische Immortalisierungsprotokolle zu generieren, um den Immortalisierungsprozess robuster und kontrollierbarer zu machen. Dafür wurden Kombinationen aus Genen zusammengestellt, die sich bereits laut Integration als wichtig für die Immortalisierung erwiesen haben. Dies beinhaltete Kombinationen der Gene E6, E7, Bmi1, Nanog und ID2. Trotz vieler Ansätze in PASC, AoSMC und ASC (COPD) konnten in der vorliegenden Arbeit mit einem reduzierten Genpool keine erfolgreichen Immortalisierungen erzielt werden. Dies lässt sich durch Spendervarianzen, wie beispielsweise dem Isolierungsort und die Qualität des primären Ausgangsmaterials, sowie durch mögliche Unterschiede zwischen gesunden und erkrankten Spendern erklären. Abweichungen im Virusmaterial können durch eine gute Qualitätskontrolle nahezu ausgeschlossen werden. Für eine Wiederholung des Experiments müsste der Versuchsaufbau anders gestaltet werden. Die Immortalisierung der BSMC müsste erfolgreich mit den Genen E6, E7, Bmi1 und Nanog wiederholt werden, um zu bestätigen, dass die Immortalisierung der BSMC mit dem reduzierten Genset reproduzierbar ist (technische Replikate). Erst wenn dies bestätigt ist, kann versucht werden, die Anzahl an immortalisierenden Genen beispielsweise von vier auf drei zu senken, um eventuelle durch die Immortalisierung auftretende Abweichungen vom primären Phänotyp zu minimieren. Anschließend müsste die Genkombination, die zur erfolgreichen Immortalisierung führte, nun an primären BSMC eines zweiten Spenders getestet werden (biologische Replikate). Sollte

auch dies erfolgreich sein, können nun primäre Glattmuskelzellen anderer Lokalisationen wie die PASMC mit Hilfe des reduzierten Genpools infiziert werden.

Zusätzlich muss beachtet werden, dass durch die ungerichtete Integration der Gene Unterschiede in den Expressionshöhen und der Stabilität der Expression auftreten können, die derzeit nicht gesteuert werden können. Auch können eventuelle Beeinflussungen anderer Signalwege nicht kontrolliert werden. Daher ist es für eine reproduzierbare Zellimmortalisierung wichtig, die Integration und Expression der immortalisierenden Gene sowie die Wechselwirkungen mit den verschiedenen Signalwegen genauer zu untersuchen, um zu verstehen, wie diese Prozesse beeinflusst werden können.

4.2 Analyse des Glattmuskelphänotyps

Die Glattmuskulatur ist die Muskulatur der inneren Organe (Pollard und Earnshaw 2007). So kommen Glattmuskelzellen unter anderem in den Atemwegen, dem Magen-Darm-Trakt oder den Blutgefäßen vor (Sweeney & Hammers, 2018).

4.2.1 Morphologie und spezifische Markerexpression

Glattmuskelzellen zeigen eine langgezogene, spindelförmige Morphologie (Hafen und Burns 2019). Die Zellen weisen einen Zellkern pro Zelle auf, sind rund im Zentrum und zugespitzt zu den Enden hin. Glattmuskelzellen lagern sich zu dichten Zellverbänden beziehungsweise Schichten zusammen. Die Zelllängen variieren von 50-200 μm und die Zelldurchmesser messen circa 2-8 μm (Sweeney und Hammers 2018). Dies ist in etwa vergleichbar mit den Abmessungen der primären Zellen, die als Ausgangsmaterial für die Immortalisierungen verwendet wurden. pBSMC, pPASMC, pAOSMC und ASMC (COPD) zeigten Zelllängen von ungefähr 200-300 μm auf und Zelldurchmesser von circa 10-15 μm . Die in dieser Arbeit generierten BSMC Linien sind den pBSMC morphologisch sehr ähnlich. Sie zeigen die typische spindelförmige Morphologie mit Zelllängen von 250 μm und Durchmessern von 14 μm . Die Morphologie der BSMC Linien veränderte sich nicht während der Langzeitkultivierung. Im Gegensatz zu den BSMC änderten sich die Zellformen der PASMC Linien sowie auch der AoSMC und ASMC (COPD) Linien. Zellen der AoSMC Linien waren deutlich weniger ausgestreckt als die pAoSMC in p 7. Die PASMC und ASMC (COPD) Linien zeigten eine quaderförmige Struktur mit Ausdehnungen von ~50 μm und Breiten von ~30-35 μm . Die Veränderung der Morphologie kann entweder ein Effekt der

Immortalisierung sein, wie in Abschnitt 4.1 diskutiert, oder sie deutet auf eine Dedifferenzierung der Zellen in Kultur hin.

Mehrere Studien konnte bereits belegen, dass der Glattmuskelphänotyp sich in „kontraktil“ und „synthetisch“ unterteilen lässt (Rensen, Doevendans und Van Eys 2007; Beamish et al. 2010; Scirocco et al. 2016; Frisanti et al. 2018). Während der kontraktile Phänotyp durch eine spindelförmige Morphologie sowie die verstärkte Expression kontraktile Marker wie ACTA2, Calponin, MYH11, Sm22- α und h-Caldesmon gekennzeichnet ist, lässt sich der synthetische Phänotyp an einer verkürzten, quaderförmigen Morphologie sowie der verminderten Expression der kontraktile Marker erkennen (Beamish et al. 2010; Metz, Patterson und Wilson 2012; Allahverdian et al. 2018). Typisch für den synthetischen Phänotyp ist eine starke Proliferation, die vermehrte Produktion extrazellulärer Matrixproteine sowie die Hochregulierung der Proteine Vimentin, MYH10 und Tropomyosin 4 (Beamish et al., 2010). Die Änderung des Phänotyps von kontraktil zu synthetisch wurde als Folge pathologischer Veränderungen wie Restenose oder Atherosklerose, aber auch während der in-vitro Kultivierung primärer Glattmuskelzellen beobachtet (Beamish et al. 2010; Metz, Patterson und Wilson 2012). Somit könnte es sich bei der veränderten Morphologie der PASMC, AoSMC und ASMC (COPD) auch um die Dedifferenzierung hin zum synthetischen Phänotyp handeln. Auch bei der Differenzierung von iPSC sowie Vorläuferzellen zu ausdifferenzierten SMC wird die synthetische Zellmorphologie zusammen mit der verminderten Expression kontraktile Proteine beobachtet (Yang et al. 2016; Kumar et al. 2017). Eine sehr schwache Expression kontraktile Marker wie ACTA2, MYH11, Sm22- α , h-Caldesmon und Calponin konnte auch in den BSMC und PASMC Linien sowie auch in den primären dazugehörigen Zellen in der vorliegenden Arbeit mittels qRT-PCR und Immunzytochemie beobachtet werden. Primäre Zellen scheinen die Expression wichtiger Markergene innerhalb weniger Passagen herunterzuregulieren. Dies wurde auch in Metz et al. beschrieben, wo eine verminderte spezifische Genexpression in vaskulären Glattmuskelzellen bereits nach wenigen Tagen festzustellen war (Metz, Patterson und Wilson 2012). In einer anderen Studie wurden iPSCs zu SMC differenziert und die ausdifferenzierten pSMC anschließend kultiviert (Zhou et al. 2018). Dabei war innerhalb von 3 Passagen (p1-p4) eine leichte, jedoch nicht signifikante, Reduktion der Expression von Calponin, ACTA2 und Sm22- α zu beobachten.

4.2.2 GPCR-Rezeptorexpression und Kontraktion

Die Hauptfunktion der glatten Muskulatur ist die Kontraktion (Pollard und Earnshaw 2007; Alberts et al. 2015). Sie drückt sich durch die Peristaltik im Magen-Darm-Trakt, der

Regulierung des Blutdrucks in den Gefäßen oder auch durch das Aufstellen der Härchen in der Haut aus. Die Kontraktion von Glattmuskelzellen wird als langsam, stark und effizient beschrieben und erfolgt unwillentlich (Pollard und Earnshaw 2007). Durch Auslösen eines Aktionspotentials sowie durch Hormon- oder Neurotransmitterbindung kommt es zum Einstromen von Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum oder dem Extrazellularraum (Alberts et al., 2015). Es kommt zur Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und zur Bildung von Ca^{2+} /Calmodulin Komplexen (Lam, Lamanna und Bourke 2019). Diese aktivieren die *myosin light chain kinase* (MLCK), die daraufhin die leichte Kette des Myosins phosphoryliert (Kim et al. 2008; Sweeney und Hammers 2018). Querbrückenbindungen mit Aktin entstehen und Kraft wird generiert. Auf der Oberfläche von Glattmuskelzellen befinden sich zahlreiche G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) an die Hormone oder Neurotransmitter binden können und somit die Kontraktion ausgelöst werden kann (Wright et al. 2013). Zu den Auslösern, die über GPCR-Signalwege die Kontraktion initiieren, gehören beispielsweise Acetylcholin, Methacholin, Carbachol, Adrenalin, Endothelin-1, GABA, Histamin sowie Serotonin (Liu et al. 2015; Kumar et al. 2017; Lam, Lamanna und Bourke 2019). In der vorliegenden Studie wurde die Kontraktion in Reaktion auf Histamin, Methacholin und Serotonin untersucht. Die Ausschüttung der Ca^{2+} konnte mittels des Calciumindikators Fluo-4 detektiert werden. Die Daten der Arbeit konnten zeigen, dass Linien der BSMC, PASMC und ASMC (COPD) Histaminrezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren und es nach Stimulation mit 1-100 μM Histamin zur Ausschüttung von Ca^{2+} kam. Die ASMC (COPD) sowie die PASMC waren sensibler als die BSMC und reagierten auch auf 0,1 μM Histamin. Auch verlief das Abflachen der Fluoreszenzintensität nach Stimulation bei den ASMC (COPD) sowie bei den PASMC deutlich langsamer als bei den BSMC. Vergleicht man die Änderung der Fluoreszenzintensität nach Stimulation mit Histamin zwischen den immortalisierten BSMC und den primären BSMC, so fielen diese in allen getesteten Konzentrationen sehr ähnlich aus. Auch die primären Zellen zeigten keine Signalverstärkung bei Stimulation mit 0,1 μM Histamin. Bei 1 μM Histamin wurde eine Verdopplung bis Verdreifachung der Fluoreszenzintensität beobachtet, die aber bei beiden bis zum Ende der Messung wieder auf die Anfangssignale absanken. Bei Stimulation der immortalen BSMC sowie der primären BSMC mit 10-100 μM Histamin wurde die Basisfluoreszenz, die zu Beginn der Messung aufgezeichnet wurde, bis zum Ende dieser nicht erreicht. Damit zeigte der Vergleich der immortalen BSMC mit den primären Zellen, dass sich die Expression der Histaminrezeptoren auf der Oberfläche der Zellen durch die Immortalisierung nicht verändert hat. Die primären Zellen der PASMC sowie der ASMC (COPD) konnten aufgrund der geringen Zellmenge und frühzeitig einsetzender Seneszenz nicht mit analysiert werden. Das verstärkte Einstromen von Ca^{2+} nach Histaminstimulation in humanen Atemwegsglattmuskelzellen wurde auch in Pantazaka et al. und Dale et al.

untersucht (Pantazaka et al. 2013; Dale et al. 2017). In beiden Studien wurden die Ca^{2+} -Konzentration durch Kalibrierung der Fluoreszenzsignale ermittelt. Somit war nach Stimulation mit 100 μM Histamin ein Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration von 0 auf 300 nM zu detektieren (Pantazaka et al. 2013). Die Ca^{2+} -Konzentration nahm nach der Stimulation kontinuierlich ab, erreichte aber, wie auch bei den hier getesteten BSMC, bis zum Ende der Messung (ca. 270 s) nicht die Konzentration von 0 nM (Pantazaka et al. 2013). Weiterhin wurde gezeigt, dass die ASMC bereits schwach auf 0,1 μM Histamin reagierten, wie es auch bei den PASMC und ASMC (COPD) Linien dieser Arbeit gezeigt wurde. In Dale et al. wurden BSMC von drei verschiedenen Spendern (4, 11 und 37 Jahre alt) analysiert (Dale et al. 2017). Die Reaktionen der Spender auf Histamin waren sehr ähnlich. Bereits Histaminkonzentrationen von 0,01 μM Histamin führten zu einem leichten Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration auf 10-100 nM (Dale et al., 2017). Die Zellen waren somit sensibler als die hier getesteten. Bei 100 μM Histamin stieg die Ca^{2+} -Konzentration von 0 nM auf ungefähr 350-600 nM, ähnlich wie bei Pantazaka et al., an (Pantazaka et al. 2013; Dale et al. 2017). In einer weiteren Studie von Mauban et al. wurde die Stimulation von PASMC mit Histamin analysiert (Mauban et al., 2007). Diese zeigten nach Stimulation mit 12,5 μM Histamin eine Verdopplung bis Verdreifachung der Fluoreszenzintensität, wie sie auch bei den immortalen PASMC beobachtet wurde. Je nach analysiertem Bereich konnten Mauban et al. zusätzlich oszillierende Zellen in den Proben ausfindig machen (Mauban et al., 2007).

Neben der Histaminrezeptorexpression wurden die BSMC und die ASMC (COPD) auch auf die Expression des Muskarinrezeptors analysiert. Die Expression der Muskarinrezeptoren M_2 und M_3 ist charakteristisch für Atemwegsglattmuskelzellen (Frederick, Gregory und Evette 1999; Buels und Fryer 2012). Der Nachweis der Rezeptorexpression kann durch Stimulation mit Carbachol oder Methacholin (MCh) erfolgen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es bei ASMC (COPD) nach Stimulation mit 0,1 μM MCh zum Einstromen von Ca^{2+} kam und damit verbunden zu einer Verdopplung der Fluoreszenzintensität. Bei Erhöhung der MCh-Konzentration auf 1 μM wurde keine Signaländerung festgestellt. Die in dieser Studie getesteten BSMC reagierten nicht auf MCh. Primäre sowie die immortalen Zellen zeigten nach Behandlung mit verschiedenen MCh-Konzentrationen (0,1-100 μM) keine Veränderung der Fluoreszenzintensität. Das zeigt, dass der Verlust der Muskarinrezeptoren kein Effekt der Immortalisierung war, sondern bereits das primäre Ausgangsmaterial keine Expression zeigte. Ähnliches wurde in Dale et al. beobachtet. Hier reagierten lediglich die humanen ASMC eines von drei Spendern auf Carbachol (Dale et al., 2017). Die Reaktion dieses Spenders zeigte eine deutlich schwächere Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration als nach der Stimulation mit Histamin. Die Stimulation mit 10 μM Carbachol führte zum Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration von 0 nM auf circa 200 nM (Dale et al., 2017).

Wichtig für die Regulierung des Drucks in den Gefäßen ist die Stimulierbarkeit der Zellen über den 5-Hydroxytryptamin (5-HT)-Rezeptor (MacLean, 2018). Um die Expression von 5-HT-Rezeptoren auf der Oberfläche der PASMC zu analysieren, wurden diese mit Serotonin stimuliert. Dabei zeigte sich, dass es nach Anregung der PASMC mit 1-10 μM Serotonin zu einer leichten Verstärkung des Fluoreszenzsignals kam. Somit sind die Zellen über 5-HT-Rezeptoren stimulierbar. Allerdings lässt sich auch beobachten, dass die Ausschüttung von Ca^{2+} nach Serotoninstimulation deutlich geringer ausfiel als nach Stimulation mit Histamin. In Xia et al. wurden murine PASMC mit 1 μM Serotonin stimuliert (Xia et al., 2013). Auch hier fiel die Ausschüttung von Ca^{2+} nach Stimulation deutlich stärker aus als bei den PASMC dieser Studie. Die Ca^{2+} -Konzentration stieg von 0 nM auf 600 nM an (Xia et al., 2013). Die Stimulierbarkeit mit Serotonin wurde in Day et al. verwendet, um das Migrationspotential der PASMC zu untersuchen (Day et al., 2006). Beim pulmonalarteriellen Hochdruck beziehungsweise der pulmonalen Hypertonie kommt es zur Gefäßumstrukturierung und damit verbunden zu einer Verdickung der Glattmuskelschicht der großen Pulmonalarterien. Frühere Studien konnten bereits zeigen, dass PASMC erkrankter Spender verstärkt 5-HT-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimierten und nach Stimulierung mit Serotonin stärker proliferierten als PASMC gesunder Spender (Marcos et al., 2004). Day et al. zeigte, dass sich bereits nach 30 minütiger Stimulierung mit Serotonin die Morphologie der PASMC änderte. Durch Depolymerisierung des Aktins rundeten sich die Zellen ab und bildeten dendritische Ausläufer. Weiterhin wurde beobachtet, dass die Migration der Zellen durch Aktivierung des MAPK-Signalwegs gesteuert wurde (Day et al., 2006).

Wie oben bereits erwähnt, kommt es durch die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration zur Aktivierung der MLCK durch den Ca^{2+} /Calmodulin Komplex. Die anschließende Phosphorylierung der leichten Kette des Myosins führt daraufhin zur Kontraktion der Zellen. Um die Kontraktion der immortalen Glattmuskelzellen zu analysieren wurde zunächst der Kollagengel-Kontraktionsassay angewandt. Dabei werden die Zellen in ein Kollagengel eingebettet (Sakota et al., 2014). Durch Stimulation der Zellen im Gel kommt es durch die Kontraktion beziehungsweise dem Zusammenziehen der Zellen auch zum Zusammenziehen der gesamten Gelfläche. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigten einige Schwierigkeiten bei der Durchführung des Tests. Zum einen sind hier die zellunabhängige Zugfestigkeit des Kollagens zu nennen, die die Gele bereits vor der Analyse stark zusammenschrumpfen ließen, und zum anderen das Anlagern der Zellen im Gel. Nach Einbettung der Zellen zeigten diese eine ausgestreckte Morphologie sowie eine gute Verteilung im Gel, jedoch reagierten die Zellen trotz bereits nachgewiesener Rezeptorexpression nicht mit Kontraktion.

Dieser Assay wird in verschiedenen Studien zur Bestimmung der Kontraktion verwendet. Auch Sakota et al. beschrieb das spontane Zusammenziehen der unstimulierten Gelfläche

um 10 % (Sakota et al., 2014). Zusätzlich konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass sich die mit humanen BSMC-beladene Gelfläche nach Stimulation mit 100 μM um weitere 40 % zusammenzog. In einer anderen Studie von Kumar et al. wurden humane pluripotente Stammzellen (hPSC) zunächst zu mesenchymalen Angioblasten und dann weiter zu ausdifferenzierten Glattmuskelzellen differenziert (Kumar et al., 2017). Die Stimulation dieser im Gel-eingebetteten Zellen mit 1 μM Carbachol zeigte ein Schrumpfen der Gelfläche um 50 %. In Iyer et al. wurde die Kontraktion der Zellen über die Veränderung der Fläche vor und nach der Stimulation ermittelt (Iyer et al. 2016). Zuvor wurden dafür hPSC zu epikardialen Glattmuskelzellen differenziert. Die Zellen wurden vor und während der Stimulation mit Carbachol über Zeitraffer-Mikroskopie analysiert. Die Auswertung von 10 Zellen ergab ein Schrumpfen in der Zellfläche um 20 % nach Stimulation (Iyer et al., 2016). In einer anderen Studie wurde die Kontraktion synthetischer Glattmuskelzellen mit der Kontraktion kontraktile Glattmuskelzellen verglichen (Yang et al. 2016). Dafür wurden hiPSC durch bestimmte Medienzusätze in den synthetischen oder kontraktile Glattmuskelphänotyp differenziert. Die Analyse der Kontraktion in einem Fibrinogel zeigte, dass sich die Gelfläche der kontraktile SMC nach Stimulation mit 10 μM Carbachol um 73 % verkleinerte, während sich die Fläche der synthetischen SMC lediglich um 54% verringerte (Yang et al. 2016). Um die Kontraktion der hier generierten Glattmuskelzelllinien untersuchen zu können, wurde sich anstelle des Kollagengels einer anderen Methode bedient. Dafür wurden immortale BSMC, PASMC und ASMC (COPD) auf porcine, dezellularisierte Lungen-Präzisionsschnitte (PCLS) angesiedelt. Diese bieten die Vorteile der physiologischen Struktur und Beschaffenheit der ECM, die eine in-vivo-ähnliche Kultivierung ermöglichen, sowie die Unabhängigkeit von einer Plastikmatrix oder eines starren Gels und damit verbunden eine einfache Messung der Kontraktion ermöglichen.

Die Kontraktion der besiedelten Schnitte wurde am Durchlichtmikroskop über die Zeit bestimmt. Die Daten zeigen, dass sich die Fläche des Bronchus sowie der Schnitte, die mit immortalen BSMC besiedelt waren, nach Stimulation mit 1 μM Histamin um 8-10% verkleinerten und somit die Zellen auf den Schnitten kontrahierten. Auch immortale PASMC kontrahierten nach Stimulation mit 1 μM Histamin. Hier verkleinerte sich die Fläche des Schnitts ebenfalls um circa 10 %. PASMC reagierten auch auf die Stimulation mit Serotonin mit Kontraktion. Die serielle Erhöhung der Serotoninkonzentration führte insgesamt zur Verringerung der Schnittfläche um 10 %. Vergleicht man diese Änderung mit den Daten von Sakota et al., so lässt sich erkennen, dass bei Sakota et al. eine 100-fach stärkere Histaminkonzentration nötig war, um ein Schrumpfen der Gelfläche um 40 % zu beobachten (Sakota et al., 2014). Die Kontraktionen der immortalen Zellen zeigen annähernd ähnliche Werte wie bei Iyer et al. (Iyer et al., 2016). In der vorliegenden Studie kann durch eine starke Besiedlung davon ausgegangen werden, dass für die Messung der Kontraktion statistisch

gesehen, die Analyse einer größeren Zellzahl zugrunde liegt. Außerdem muss beachtet werden, dass die Zellstimulation mit Carbachol erfolgte. In Yang et al. sowie Kumar et al. konnten, prozentual gesehen, deutlich stärkere Kontraktionen ($\geq 50\%$) beobachtet werden (Yang et al. 2016; Kumar et al. 2017). Allerdings erfolgte auch hier die Stimulation mit Carbachol und kann daher nicht direkt verglichen werden.

Neben den immortalen PASMC und BSMC wurden auch die immortalen ASMC (COPD) auf die Gerüste der Schweinelunge gesät. Trotz der nachgewiesenen Histaminrezeptorexpression konnte auf den PCLS keine Kontraktion nach Histaminstimulation detektiert werden. Allerdings konnten die Daten zeigen, dass mit Stimulation verschiedener Methacholinkonzentrationen insgesamt eine Reduktion der Schnittfläche um 7 % beobachtet werden konnte. Anders als bei der Analyse der Ca^{2+} -Konzentration wurde die stärkste Kontraktion nach Stimulation mit 10 μM und 100 μM MCh ausgelöst. Dies lässt entweder den Schluss zu, dass die ASMC (COPD) auf dem Gerüst weniger sensitiv sind beziehungsweise die Besiedlungsdichte auf dem Gerüst zu gering war, da ihnen vielleicht etwas im Medium fehlte und die Kultivierung von einer Woche nicht optimal war, oder dass die ASMC (COPD) auf dem Gerüst und der ECM eines gesunden Schweins ihre pathologische Hypersensibilität verlieren. Dass die ECM im Falle einer COPD Erkrankung verändert ist, konnte bereits nachgewiesen werden (Bidan, Veldsink, Meurs, & Gosens, 2015). So sind verringerte Anteile von Elastin, Proteoglykanen (Biglycan und Decorin) und Collagen I und III sowie ein Anstieg von Glykoproteinen wie Fibronectin, Hyaluronsäure oder Tenascin zu beobachten (Bidan et al., 2015).

Der Einfluss der extrazellulären Matrix auf normale humane bronchiale Epithelzellen (NHBE-Zellen) wurde in Hedström et al. untersucht (Hedström et al., 2018). Dafür wurden gesunde NHBE-Zellen auf dezellularisierten, bronchialen ECM-Gerüsten von COPD Spendern sowie gesunden Spendern ausgesät und über 7 - 35 Tage kultiviert. Dabei wurde Interessantes festgestellt. Das Genexpressionsprofil der gesunden NHBE-Zellen zeigte nach siebentägiger Kultivierung eine veränderte Aktivierung von Genen, die relevant für die COPD Erkrankung sind. Diese sind in Signalwege wie Regeneration (*Hepatocyte growth factor*), Umstrukturierung (TGF- β 1), Apoptose (p53), Vaskularisierung (Endothelin-1 und PDGF-BB) und Entzündungsreaktionen (IFN) involviert (Hedström et al., 2018). Nach 35 Tagen auf dem Gerüst konnte diese veränderte Genaktivierung zwischen den Zellen des erkrankten beziehungsweise gesunden Gerüsts nicht mehr detektiert werden. Während laut RNA-Seq nach siebentägiger Kultivierung 701 Gene unterschiedlich exprimiert wurden, waren es nach 21-35-tägiger Kultivierung lediglich 2. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Zellen innerhalb von 35 Tagen auf dem Gerüst differenzieren und sich in der Expression wichtiger Proteine, wie FoxJ1 oder MUC5AC, nicht von den Zellen unterscheiden, die auf gesunden Gerüsten kultiviert wurden. Dies bedeutet, dass im frühen Stadium der Differenzierung durch

Gerüste erkrankter Spender eine veränderte Genexpression in den NHBE-Zellen induziert wird (Hedström et al., 2018). Dies könnte in umgekehrter Weise für die hier getesteten ASMC (COPD) zutreffen, deren Hypersensibilität sich auf dem gesunden Lungengerüst reduzierte.

In den sich anschließenden Versuchen wurde durch die Inhibition des H1-Rezeptors durch das Antihistaminikum Levocetirizin das Potential der generierten Linien für die Wirkstoffentwicklung deutlich. Durch Inhibition des H1-Rezeptors werden die Wirkungen des körpereigenen Botenstoffs Histamin unterdrückt und die Auslösung einer Allergie dezimiert. Antihistaminika sind somit wichtige Arzneimittel für Allergiker (z.B. Heuschnupfen, Hausstaubmilbe), spielen aber auch eine therapeutische Rolle bei allergiebedingtem Asthma oder COPD Patienten, da die Symptome dieser chronischen Erkrankungen bei Allergikern stärker in Erscheinung treten. Die Ergebnisse dieser Studie konnten zeigen, dass durch hohe Konzentrationen an Levocetirizin (1-10 μM) die Ausschüttung von Ca^{2+} und somit ein Anstieg der relativen Fluoreszenzintensität in immortalen BSMC und PASMC komplett verhindert werden konnte. Dies war auch bei geringen Mengen an Levocetirizin (0,1 μM) zu beobachten. 0,1 μM Levocetirizin führte zur totalen Hemmung des H1-Rezeptor-Signalwegs. Somit konnte auch gezeigt werden, dass die Ausschüttung von Ca^{2+} nach Histaminstimulation ausschließlich über Aktivierung des H1-Rezeptors erfolgte. Um zu sehen, ob die Zellen in einer in-vivo-ähnlicheren Umgebung gleich reagieren und durch die Hemmung der Ca^{2+} -Ausschüttung auch eine Hemmung der Kontraktion zu beobachten ist, wurden mit PASMC-besiedelte PCLS nach Vorstimulation mit Histamin stimuliert und untersucht.

Die Daten zeigten, dass auch die Kontraktionen vorstimulierter PASMC deutlich geringer ausfielen, was durch eine verringerte Abnahme der Ausgangsfläche gezeigt werden konnte. Somit zeigen die Daten, dass die Auslösung der Kontraktion Ca^{2+} -abhängig war und die Hemmung des H1-Rezeptors zur Verminderung der Kontraktion führte. In Liu et al. wurde der Effekt von Levocetirizin an Glattmuskelstreifen der Ratten getestet (Liu et al. 2015). Hierfür wurden die Glattmuskelstreifen der Trachea mit Methacholin (1 μM) kontrahiert und anschließend mit Levocetirizin behandelt. Diese Studie zeigte die Relaxation der Zellen nach Stimulation mit Levocetirizin. Allerdings waren bei geringen Konzentrationen an Levocetirizin nur schwache Auswirkungen auf die Kontraktion zu beobachten. Höhere Levocetirizinkonzentrationen (10-100 μM) führten zu stärkeren Relaxationen (Liu et al. 2015). Die Abweichungen in der Wirkung der Levocetirizinkonzentrationen lassen sich damit erklären, dass es sich in Liu et al. nicht um die Stimulation einzelner Zellen, sondern eines gesamten Muskelbands handelte und somit höhere Konzentrationen für die Relaxation nötig waren. Des Weiteren können die Unterschiede mit der Analyse verschiedener Spezies (Mensch vs. Ratte) begründet werden.

Die Ausschüttung von Ca^{2+} nach Stimulation mit Histamin konnte auch bei ASMC (COPD) durch Vorstimulation mit Levocetirizinkonzentrationen von 1-10 μM vollständig inhibiert werden. Interessanterweise reichten aber geringere Konzentrationen an Levocetirizin (0,1 μM) nicht aus, um einen Anstieg der Fluoreszenzintensität zu verhindern. Auch die Reduzierung von Histamin von 10 auf 1 μM führte zum Einströmen von Ca^{2+} . Somit war ein deutlicher Unterschied zwischen gesunden Atemwegsglattmuskelzellen und denen des COPD Spenders zu beobachten. Für eine vollständige Signalhemmung war bei den erkrankten Zellen die 10-fache Dosis des Antihistaminikums nötig. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit von zellulären Testsystemen erkrankter Spender. Um die Aussagen zu bestätigen, müssen in zukünftigen Versuchen Zellen weiterer erkrankter Spender in die Auswertung einbezogen werden sowie auch die Wirkung weiterer Antagonisten getestet werden. Außerdem muss die Stabilität der COPD SMC Phänotypen bestätigt werden, sodass sichergestellt ist, dass es sich bei Zellen der Passage 40 weiterhin um erkrankte Zellen handelt.

4.3 Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf den Glattmuskelphänotyp

Um ein in-vivo-ähnliches Glattmuskelzellsystem aufzubauen, ist neben der Zelllinie auch eine möglichst physiologische Kultivierungsumgebung entscheidend. Dafür wurden in dieser Studie verschiedene Ansätze getestet. Für die Expansion und die alltägliche Kultivierung der entstandenen Zelllinien wurde ein Medium verwendet, das *Epithelial Growth Factor* (EGF), *Fibroblast Growth Factor-2* (FGF-2) und Insulin als Zusätze enthielt. EGF, FGF-2 und Insulin regen die Proliferation sowie Migration der Zellen an und unterstützen damit teilweise den synthetischen Phänotyp. Gleichzeitig sorgt Insulin aber auch für den Erhalt der kontraktilen Eigenschaften beispielsweise vaskulärer Glattmuskelzellen (Peehl und Sellers 1998; Wang, Gurevich und Draznin 2003; Hebert et al. 2009; Schreier, Gekle und Grossmann 2014; Chen et al. 2016). Das Kultivierungsmedium bestehend aus EGF, FGF-2 und Insulin eignete sich für die Langzeitkultivierung der generierten Glattmuskelzellen. Zusätzlich konnte während der Zellkultivierung im beschriebenen Medium die Expression wichtiger GPCRs auf den Zelloberflächen nachgewiesen werden. Auch die Kontraktion der Zellen konnte in dem Medium gezeigt werden. Allerdings bedurfte es hierfür zusätzlich der Verwendung eines 3D-Lungengerüsts. Die Mehrheit der Zellkulturstudien werden aufgrund der einfachen Handhabung sowie der Vielfalt an Analysemethoden und des Kostenaspekts in 2D durchgeführt (Edmondson et al. 2014; Knight und Przyborski 2015; Kapałczyńska et al. 2018). So wachsen adhärente Zellkulturen einschichtig auf Plastikunterlagen an. 2D

Kultursysteme sind ein wertvolles Werkzeug für zellbasierte Studien, allerdings sind sie nicht in der Lage die Komplexität der dreidimensionalen physiologischen Zellumgebung widerzuspiegeln (Edmondson et al. 2014; Knight und Przyborski 2015; Kapałczyńska et al. 2018). So kann das Anheften an einer künstlichen, starren Oberfläche zur Veränderung der Morphologie, des Zellmetabolismus sowie der Funktionalität führen (Knight und Przyborski 2015). Die Kultivierung der Zellen in 3D ermöglicht es den Zellen dagegen miteinander zu interagieren und über Zell-Zellkontakte in alle Richtungen miteinander in Kontakt zu treten. Nicht nur die Interaktionen der Zellen untereinander, sondern auch zwischen Zellen und ECM können in 3D gewährleistet werden. Dies ermöglicht eine in-vivo-ähnlichere Kultivierungsoption, wodurch geringere Abweichungen im Zellphänotyp beobachtet wurden (Hong und Stegemann 2008; Bono et al. 2016). So konnte beispielsweise in Bono et al. gezeigt werden, dass vaskuläre Glattmuskelzellen, die in 3D auf Typ 1- Kollagen Hydrogelen kultiviert wurden, sich nach mechanischer Stimulation physiologischer und stärker ausrichten als Zellen der 2D Kultur (Bono et al., 2016). Zusätzlich wurde nach Stimulation eine Verdopplung der ACTA2 Expression und eine 14-fache Erhöhung der Calponinexpression in 3D beobachtet. Die Expression dieser Proteine wurde in 2D nicht beeinflusst. Zur Messung der Kontraktion wurde Zellen der Glattmuskellinien auf porcine Lungengerüste (PCLS) ausgesät. Die Zellen konnten somit in einer dreidimensionalen Umgebung miteinander sowie auch mit der extrazellulären Lungenmatrix interagieren. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie konnten dabei zeigen, dass sich die Zellen auf dem gesamten Gerüst anlagerten. Auch konnte gezeigt werden, dass die Zellen das Gerüst als Vorlage nahmen um daran entlang zu wachsen. Nach einer Woche in Kultur waren große Teile beziehungsweise gesamte Gerüste besiedelt. Interessanterweise konnte eine Änderung der Morphologie in 3D beobachtet werden. PASMC und ASMC (COPD), die in der 2D Kultur eher eine quaderförmige Morphologie aufwiesen, schienen ausgestreckter und spindelförmiger auf dem Gerüst, was eher der typischen Glattmuskelmorphologie entspricht. Neben der 3D-Kultivierung auf PCLS wurde eine andere 3D-Kultivierungsmethode getestet. Dabei handelte es sich um die Bildung von Zellaggregaten, sogenannten Sphäroiden. Diese formen sich, wenn das Anheften der Zellen am Untergrund verhindert wird. Durch das Aggregieren der Zellen können diese stärker miteinander interagieren und ihre eigene ECM ausbilden. Diese einfache und schnell umsetzbare Methode, die sich auch für die Analyse im Hochdurchsatz eignet (Boyer et al., 2018), wurde gewählt, um möglicherweise die Expression wichtiger Glattmuskelmarker durch eine 3D-Umgebung zu verstärken, da diese in 2D im gewöhnlichen Kultivierungsmedium sehr gering war. Nach der Kultivierung der Sphäroide für eine Woche in Kultur konnten jedoch mittels Immunzytochemie keine Unterschiede in den Expressionen von ACTA2 und Calponin beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass diese 3D-Kultivierungsmethode allein die Ausprägung des Glattmuskelphänotyps nicht verstärkte. Im

Vergleich dazu wird in anderen Studien, in denen Glattmuskelzellen in 3D kultiviert wurden, oft die Verwendung von Hydrogelen, bestehend beispielsweise aus Gelatine und mikrobieller Transglutaminase (mTgase), Kollagen oder Kollagen und Fibrin, Dextran-Lysin-Gelatine, als erfolgreich beschrieben (Hong und Stegemann 2008; Liu et al. 2012; Tijore et al. 2018; Bono et al. 2016).

Neben der Steigerung der Glattmuskeleigenschaften wurden in 3D auch die physiologischen Funktionen der PASMC im Bereich der Gefäßbildung mittels des Sprouting-Tests untersucht. PASMC stammen aus der Pulmonalarterie, wo sie der Hauptzelltyp der mittleren Gefäßschicht, der *Tunica media*, sind und mit Endothelzellen und Fibroblasten interagieren. Für den Versuch wurde Sphäroide aus PASMC, Endothelzellen oder PASMC und Endothelzellen gebildet, die anschließend für 24 h in ein Kollagengel eingebettet wurden. Nach 24 h im Kollagengel konnte die Interaktion von Endothelzellen und PASMC beobachtet werden. Aus den Sphäroiden der Kokultur konnten Verästelungen beziehungsweise das Auswachsen von Tunneln beobachtet werden, was in den Monokulturen deutlich weniger ausgeprägt war. Auch konnte in der Kokultur festgestellt werden, dass die PASMC sich eher im Zentrum des Sphäroids anlagerten. Die Endothelzellen waren auch im Zentrum angesiedelt, wuchsen aber stärker und schneller nach außen aus. Diese physiologische Anlagerung wurde auch von Pfisterer und Korff beobachtet (Pfisterer und Korff 2016). Um genauere Aussagen bezüglich der Zelllokalisierung machen zu können, sind Z-Stack Aufnahmen der einzelnen Sphäroidschichten nötig.

Parallel zur 3D-Kultivierung wurden die Kultivierungsbedingungen in 2D durch Verwendung zweier verschiedener Medien getestet. Diese wurden auf deren Potential hin untersucht, die Expression glattmuskelspezifischer Gene zu steigern. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Kultivierung von Glattmuskelzellen im serumfreien Medium zur Steigerung des kontraktiven Glattmuskelphänotyps führt (Ma, Wang und Newman 1998; Han et al. 2006; Stamatiou et al. 2014). So konnte in Ma, Yang und Newman beobachtet werden, dass Glattmuskelzellen der Trachea des Hundes für 15 Tage ohne Serum kultiviert werden können. Ab Tag 6 wurde dabei ein deutlicher Anstieg von ACTA2, MHC und MLCK mittels RT-PCR und Fluoreszenzfärbung festgestellt (Ma et al., 1998). Ähnliches konnte in Stamatiou et al. gezeigt werden. Hier wurden Glattmuskelzellen der Trachea des Kaninchens für bis zu 30 Tage ohne Serum kultiviert. Dabei war die Morphologie der im serumfreien Medium kultivierten Zellen spindelförmiger im Vergleich zur Kultur mit 10 % FBS, während sie im Medium mit 10 % FBS eher flach erschienen. Die Proteinanalyse mittels Westernblot und Immunfluoreszenz ließ nach 15-tägiger Inkubation eine deutliche Reduktion von ACTA2, Calponin und MHC- β in den mit 10 % FBS kultivierten Zellen im Vergleich zu der serumfreien Kultur erkennen (Stamatiou et al., 2014). In Han et al. wurde ein positiver Effekt der serumfreien Kultivierung von humanen vaskulären Glattmuskelzellen bereits nach 48 h

beobachtet. Nach 48 h Kultivierung zeigten die Zellen eine sehr langgezogene Morphologie im Vergleich zur serumhaltigen Kultivierung. Auch konnte ein deutlicher Anstieg der Expression der Gene ACTA2, Calponin, MHC und Sm22 α mittels mRNA Analyse und Westernblot detektiert werden (Han et al., 2006). Die in der vorliegenden Arbeit generierten Daten weichen von den Ergebnissen der Studien ab. Zwar konnte gezeigt werden, dass humane immortale BSMC über einen Zeitraum von 12 Tagen ohne Serum kultiviert werden konnten und die Zellen eine spindelförmige Morphologie aufwiesen, jedoch war auch zu erkennen, dass nach 12 Tagen keine konfluente Zellschicht mehr zu erkennen war, da einige Zellen bereits abstarben. Auch konnte mittels des WST-Assays beobachtet werden, dass die Zellen die Proliferation komplett einstellten und innerhalb von vier Tagen kein Anstieg in der Zellzahl zu erkennen war. Weiterhin konnten mit Hilfe der Fluoreszenzanalyse nach 48 h serumfreier Kultivierung keine Veränderung in der Expression der Marker ACTA2 und Calponin ausfindig gemacht werden. Dies lässt darauf schließen, dass die gewählte Zeitspanne von 48 h möglicherweise zu kurz für die Expression der Proteine sein könnte und diese, unter Beobachtung der Vitalität der Zellen, auf vier bis sechs Tage verlängert werden müsste.

Eine andere, oft beschriebene Variante um Zellen in Richtung des glattmuskulären Phänotyps zu differenzieren, ist die Verwendung von TGF- β 1 (Chen und Lechleider 2004; Yang et al. 2011; Guo 2012; Yang et al. 2016). TGF- β 1 gehört zur TGF- β -Superfamilie und ist in zahlreiche zelluläre Funktionen involviert (Alberts et al., 2015). Während der Entwicklung ist es in die Regulation des Zellwachstums, der Proliferation, Differenzierung und Apoptose involviert. Bei Erwachsenen ist TGF- β 1 an der Gewebereparatur, der Regulation von Entzündungsreaktionen aber auch an der Entstehung von pathologischen Veränderungen beteiligt (Goldsmith et al. 2006; Alberts et al. 2015; Ojiaku et al. 2018). Viele Zellen sind in der Lage TGF- β 1 selbst zu synthetisieren. TGF- β Rezeptoren besitzen eine Serin/Threonin Kinase Domäne und setzen sich aus zwei Untereinheiten (Typ 1 und Typ 2) zusammen (Alberts et al. 2015; Zhang, Alexander und Wang 2017). Durch Bindung von TGF- β 1 kommt es zur Phosphorylierung und somit Aktivierung der Typ 1 Untereinheit durch die Typ 2 Untereinheit. Der aktivierte Typ 1 Rezeptor kann nun receptor-activated Smads (R-Smad = Smad 2 oder 3) binden und durch Phosphorylierung aktivieren. Das aktivierte R-Smad löst sich daraufhin vom Rezeptor und komplexiert mit Co-Smad (Smad 4). Der Smadkomplex wandert nun in den Zellkern, wo er die Transkription von Targetgenen kontrolliert und mit anderen transkriptionalen Regulatoren interagiert (Alberts et al. 2015; Zhang, Alexander und Wang 2017). In Yang et al. wurde für die Differenzierung von humanen iPSC zu synthetischen sowie kontraktile Glattmuskelzellen eine Kombination von VEGF-A, PDGF- β , TGF- β 1 und B27 verwendet (Yang et al. 2016). Da es sich bei Zellen der vorliegenden Studie bereits um Glattmuskelzellen handelt und da PDGF- β laut Kumar et al.

auch die Differenzierung zu Perizyten begünstigt (Kumar et al., 2017), wurden für die Steigerung der Expression glattnuskulärer Gene lediglich die Zusätze B27 und TGF- β 1 getestet. Zusätzlich wurde im Vergleich zur normalen Kultivierung die Serumkonzentration von 5 % auf 1 % gesenkt um eine mögliche Expressionssteigerung, wie bereits diskutiert, zu begünstigen. Die Ergebnisse konnten dabei zeigen, dass bereits nach 48-stündiger Inkubation im Stimulierungsmedium mit TGF- β 1 und B27 die Expression der Proteine ACTA2 und Calponin deutlich verstärkt wurde. Nach dreitägiger Stimulation waren fast alle getesteten immortalen Glattnuskulzellen positiv für Calponin und ein sehr hoher Prozentsatz auch positiv für ACTA2. Dies ließ sich auch durch eine stärkere Expression dieser sowie weiterer Markergene mittels qRT-PCR bestätigen. Diese Daten ähneln sich mit denen von Goldsmith et al. (Goldsmith et al., 2006). Hier wurden humane BSMC für 48 h mit 1 ng/ml TGF- β 1 und ohne Serum kultiviert. Nach 48 h konnte eine starke Erhöhung der ACTA2-Expression sowie auch eine verstärkte Expression von MHC mittels Westernblot und Immunfluoreszenzfärbung detektiert werden (Goldsmith et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich mittels des WST-Assays festgestellt, dass B27 die Proliferation der Zellen begünstigte, während TGF- β 1 diesen Effekt drosselte. Die Zellen teilten sich ähnlich schnell wie im Medium mit 1 % FBS ohne weitere Stimulationszusätze, jedoch deutlich langsamer als im Glattnuskulkulturmedium mit 5 % FBS. In verschiedenen Zelltypen konnte bereits beobachtet werden, dass TGF- β einen zytostatischen Effekt zeigt (Zhang, Alexander und Wang 2017). Durch Interaktion mit c-MYC wird der Zellzyklus gehemmt (Zhang, Alexander und Wang 2017).

In 2D konnte somit gezeigt werden, dass die Reduktion der Serumkonzentration in Kombination mit den Zusätzen TGF- β 1 und B27 eine deutliche Steigerung der Expression wichtiger Glattnuskulmarker in Glattnuskulzellen ermöglicht. Eine Steigerung der Rezeptoraktivität des Serotoninrezeptors in PASMC konnte nach 48-stündiger Stimulation nicht beobachtet werden. Neben der Expressionssteigerung in Glattnuskulzellen wurde die erhöhte Expression der Proteine ACTA2 und Calponin auch in stimulierten Fibroblasten beobachtet. Diese Beobachtung deckt sich mit den Daten aus Honda et al. und lässt die Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten vermuten (Honda, Yoshida und Munakata 2010). In der Studie wurden MRC-5 Zellen (diploide humane Fibroblastenzelllinie) für drei Tage mit oder ohne TGF- β 1 kultiviert. Dabei zeigte sich, dass die Proteinexpression von ACTA2 anstieg. Auch konnte gezeigt werden, dass TGF- β 1 die Proliferation der Fibroblasten hemmte (Honda, Yoshida und Munakata 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Stimulierungsmedium auch in der 3D-Kultur getestet, um zu sehen, ob dadurch die Kontraktion der immortalen BSMC noch gesteigert werden kann. Dafür wurden mit BSMC-besiedelte PCLS für 48 h im Stimulierungsmedium kultiviert, anschließend mikroskopisch analysiert und mit Histamin stimuliert. Die Ergebnisse zeigten,

dass die Inkubation im Stimulierungsmedium zur Bildung von Zellaggregaten auf den Lungengerüsten führte. Somit konnte auch keine Kontraktion mehr beobachtet werden. Ein Ansiedeln der Zellen in Grüppchen wurde auch in der 2D Kultur wahrgenommen. Das Aggregieren der Zellen in 3D könnte auch mit pathologischen Veränderungen der Zellen im Zusammenhang stehen. So ist TGF- β in verschiedene kardiovaskuläre Erkrankungen wie Atherosklerose, Aorten Aneurysmen und Bluthochdruck involviert (Guo 2012; Low, Baker und Bradshaw 2019). Viele dieser Erkrankungen entstehen durch eine Fehlregulation von Glattmuskelfunktion und Differenzierung. Erhöhte Konzentrationen von TGF- β 1 konnten auch in den Atemwegen von Asthma sowie COPD Patienten nachgewiesen werden, wo es an Entzündungsreaktionen sowie an der Umstrukturierung der Atemwege beteiligt ist (Michaeloudes et al., 2011; Ojiaku et al., 2018). Auch konnte nachgewiesen werden, dass TGF- β 1 einen Einfluss auf die Hypersensibilität hat und zu einer verstärkten Kontraktion der Atemwegsglattmuskelzellen führt (Ojiaku et al., 2018). In Atemwegsglattmuskelzellen fördert TGF- β 1 beispielsweise die Freisetzung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies durch Hochregulation der Nox4 Expression, was zur Hypertrophie der Zellen führen kann (Goldsmith et al., 2006; Michaeloudes et al., 2011).

4.4 Zusammenhang zwischen Immortalisierung und Glattmuskelphänotyp

Die generierten Glattmuskellinien der einzelnen Spender und Lokalisationen zeigten nach der Immortalisierung nur sehr geringe Abweichungen. So zeigten sie beispielsweise trotz verschiedener Immortalisierungsansätze die Integration und Expression ähnlicher beziehungsweise gleicher immortalisierender Gene, unterschieden sich jedoch kaum in der Morphologie oder Expression der Marker. Die einzige nennenswerte Ausnahme stellte die PASMC Linie 4 dar. Die PASMC Linie 4 zeigte vor sowie nach Stimulation mit TGF- β 1 und B27 keine Proteinexpression von ACTA2 sowie Calponin und somit keinen glattmuskulären Phänotyp. Trotz erfolgreicher Immortalisierung war die Expression der einzelnen Immortalisierungsgene im Vergleich zu der der anderen PASMC Linien sehr gering. Es lässt sich spekulieren, dass die zufällige Integration der immortalisierenden Gene eventuell in einem Locus erfolgte, der wichtig für den Erhalt des Glattmuskelphänotyps war. Auch lässt sich spekulieren, dass es sich bei den primären Zellen nicht um eine 100 % reine Glattmuskelpopulation handelte und eventuell ein anderer Zelltyp immortalisiert und expandiert wurde.

Ausblick

Die Daten dieser Doktorarbeit zeigen erstmalig die Generierung humaner Glattmuskelzelllinien mit Hilfe der CI-SCREEN Technologie. Es entstanden Zelllinien verschiedener Spender sowie auch Lokalisationen, die wesentliche Marker und Funktionen von Glattmuskelzellen aufweisen. Dazu zählen die Expression wichtiger GPCRs auf der Oberfläche der Zellen sowie damit verbunden die Kontraktion. Durch Optimierung der Kultivierungsbedingungen wurde ein Stimulierungsmedium ausfindig gemacht, dass die Expressionssteigerung wichtiger glattemuskulärer Gene in den Linien ermöglicht. Bezüglich der Anwendung der Linien wurde in ersten Versuchen das Augenmerk auf die Medikamententestung gelegt. So wurde mit Hilfe des Calcium Assay die Wirksamkeit eines Antihistaminikums gezeigt. Neben Glattmuskellinien gesunder Spender wurden auch Linien eines COPD Spenders generiert und charakterisiert. Bei der Testung des Antihistaminikums sind hierbei Unterschiede zwischen den gesunden und erkrankten Linien festgestellt worden. Die generierten Daten bieten die Basis für zahlreiche weitere Experimente. Dazu zählen, wie bereits erwähnt, die Testung weiterer Medikamente, das Einbeziehen zusätzlicher erkrankter und gesunder Spender und die Generierung finaler Immortalisierungsprotokolle. Um die Stabilität des COPD Phänotyps nachzuweisen, sollten charakteristische Unterschiede zwischen erkrankten und gesunden Glattmuskelzellen untersucht werden. So sind Atemwegsglattmuskelzellen COPD erkrankter Spender im Vergleich zu gesunden Glattmuskelzellen hypertroph und zeigen die Anhäufung glykolytischer Produkte wie Laktat sowie auch die Anhäufung von Glutamin, Fettsäuren und Aminosäuren (Michaeloudes et al., 2017). Weiterhin ist in COPD Glattmuskelzellen die Expression von *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4* (Nox4) hochreguliert, was die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und oxidativem Stress begünstigt (Hollins et al. 2016; Yan et al. 2018). Auch die Sekretion von Zytokinen wie TNF- α , *Thymic stromal lymphopoietin* (TSLP), CXCL1, CXCL8 und CXCL10 wurde in COPD SMC beobachtet (Barnes 2009). Um einer Veränderung des COPD SMC Phänotyps entgegenzuwirken, wäre es auch denkbar die Zellen im Zigarettenrauchextrakt zu inkubieren (Chen et al., 2014; Wylam et al., 2015). Zusätzlich wäre eine Kokultivierung lokalisationsabhängig mit Endothel- oder Epithelzellen denkbar, um eine in-vivo ähnlichere Umgebung zu schaffen und um mögliche Wechselwirkungen zu analysieren. So könnten beispielsweise Infektionsstudien durchgeführt werden. In Shariff et al. konnte nach Infektion von Atemwegsepithelzellen mit humanen Rhinoviren gezeigt werden, dass die infizierten Zellen durch Sekretion von CCL5, CXCL8 und CXCL10 Atemwegsglattmuskelzellen zur Migration anregen (Shariff et al., 2017). Ein anderer interessanter Punkt betrifft die Besiedlung der dezellularisierten PCLS. In den

vorliegenden Daten konnte beobachtet werden, dass sich die Zellen willkürlich auf dem Gerüst ansiedelten. Ein weiterer Schritt wäre beispielsweise die Besiedlung so zu kontrollieren, dass sich ASMC nur im Atemweg anheften und nicht auf dem gesamten Schnitten zu finden sind. Dies könnte eventuell durch die gezielte Zugabe der Zellen in einer dickflüssigen Nährlösung beziehungsweise Gel unter dem Mikroskop erreicht werden. Anschließend wäre die physiologische Besiedlung weiterer Zelltypen auf dem Gerüst möglich. So könnten neben physiologischen Atemwegen gesunder Spender auch Krankheitsmodelle aufgebaut werden. In Richtung personalisierter Medizin wäre beispielsweise die Isolierung und Immortalisierung verschiedener Zelltypen aus dem Gewebe eines erkrankten Spenders und der Aufbau eines Kokultursystems daraus denkbar.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Leuten danken, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt und motiviert haben und somit zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke dem gesamten InSCREENeX Team für die familiäre Arbeitsatmosphäre und den vielen unterhaltsamen Mittagspausen. Mein besonderer Dank geht hierbei an meinen Betreuer Dr. Tobias May. Tobi, vielen Dank für die Bereitstellung dieses Themas, der tollen Unterstützung während der gesamten Zeit besonders auch bei der Erstellung dieser Arbeit. Weiterhin danke ich Dir dafür, dass Du immer hinter mir gestanden hast und mir im Labor viele Freiräume gelassen hast, wodurch ich mich wissenschaftlich und auch persönlich sehr weiterentwickeln konnte. Ich danke Martin Luckner, Dr. Theresa Truschel und Dr. Tom Wahlicht für viele unterhaltsame Gespräche, hilfreiche Ideen bezüglich des Projekts und einer schönen Zeit im Labor. Tom, Dir danke ich besonders für die Erstellung des ImageJ Makros zur Auswertung des Calcium Assay. Martin, vielen Dank Dir für die Generierung der GFP-gelabelten PASMNC. Ich danke Unserer Labor-Fee Jeannette Zauers dafür, dass nie etwas im Labor gefehlt hat und Du immer alle Fragen bezüglich Bestellungen oder der Anwendung von Protokollen beantworten konntest. Ich danke auch Alessandra Buse, die ihre Bachelorarbeit bei mir angefertigt hat und wir somit viel voneinander lernen konnten.

Ich möchte ein großes Dankeschön an meinen Mentor Prof. Dr. Klemens Rottner aussprechen für die konstruktive Kritik und die vielen Vorschläge während der Thesis Komitees sowie für die Unterstützung beim Beenden der Arbeit und einer schnellen Terminfindung für die Verteidigung.

Mein weiterer Dank geht an unser Nachbarteam, der Arbeitsgruppe MSYS. Ich danke Euch für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, viele lehrreiche Seminare, interessante Gespräche und auch für das Borgen von Materialien.

Vielen Dank auch an die Graduiertenschule des HZI für die vielen Weiterbildungsangebote und Doktorandentreffen sowie die Beantwortung aller Fragen rund um die Promotion.

Ein großes Dankeschön geht an die Kooperationspartner dieses Projekts, Aspect Biosystems und das Fraunhofer ITEM in Hannover, für die hilfreichen Ideen während der Telefonkonferenzen. Ohne das Fraunhofer wäre es mir nicht möglich gewesen, die Kontraktion der Zellen auf PCLS zu zeigen. Somit danke ich Dr. Susann Dehmel, Helena Obernolte und dem ganzem Team für die 3,5 Wochen, die ich bei Euch verbringen durfte und in denen ich technisch wahnsinnig viel dazu gelernt habe.

Zusätzlich danke ich Prof. Dr. Robert Zweigert für die Einbringung interessanter Ideen und Vorschläge bei den Thesis Komitees. Ich danke ganz besonders Prof. Dr. Stephan Reichl für die freundliche und unproblematische Übernahme des Korreferates und für die

Begutachtung dieser Arbeit. Auch danke ich Prof. Dr. Reinhard Köster für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an meine gesamte Familie und meine Freunde Anna, Maria, Josi, Laura, Tessa, Kathrin, Philipp, Anne, Alex, Steffi und Stefan. Ich danke Euch für eure bedingungslose Liebe, Unterstützung, Motivation und für die vielen unvergesslichen Momente. Mein Dank geht außerdem an meinen erst kürzlich verstorbenen Opa. Opa, du hättest mir kein besserer Großvater sein können! Ich danke Dir für all die Liebe und den Stolz, den du mir entgegengebracht hast sowie die vielen Dinge, die Du mich gelehrt hast. Abschließend möchte ich mich bei einer Person bedanken, die mein Leben mit so viel Freude und Glück erfüllt. Clemens, vielen Dank für die vielen tollen Momente in unserem gemeinsamen Leben, dafür dass Du immer hinter mir stehst, für mich da bist und mir auch das Makro für die Statistiksoftware R geschrieben hast. Ich freue mich auf weitere wunderschöne Jahre mit Dir.

Referenzen

- Adcock, I., & Mumby, S. (2016). Glucocorticoids. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 171–196. https://doi.org/DOI 10.1007/164_2016_98
- Adeola, F. (2018). Normalization of Gene Expression by Quantitative RT-PCR in Human Cell Line: comparison of 12 Endogenous Reference Genes. *Ethiopian Journal of Health Sciences*, 28(6), 741–748. <https://doi.org/10.4314/ejhs.v28i6.9>
- Alberts, B. et al., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). Molecular Biology of THE CELL. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Allahverdian, S., Chaabane, C., Boukais, K., Francis, G. A., & Bochaton-Piallat, M. L. (2018). Smooth muscle cell fate and plasticity in atherosclerosis. *Cardiovascular Research*, 114(4), 540–550. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy022>
- Allen, D. D., Caviedes, R., Cárdenas, A. M., Shimahara, T., Segura-Aguilar, J., & Caviedes, P. A. (2005). Cell lines as in vitro models for drug screening and toxicity studies. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 31(8), 757–768. <https://doi.org/10.1080/03639040500216246>
- Ambady, S., Malcuit, C., Kashpur, O., Kole, D., Holmes, W., Hedblom, E., ... Dominko, T. (2010). Expression of NANOG and NANOGP8 in a variety of undifferentiated and differentiated human cells. *Int J Dev Biol*, 54(0), 1743–1754. <https://doi.org/doi:10.1387/ijdb.103192sa>
- American Thoracic Society. (2019). Chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 199, P1–P2. online verfügbar unter: <https://www.thoracic.org/patients/patient-resources/resources/copd-intro.pdf>; zuletzt geprüft am 05.12.2019
- Amrani, Y., & Panettieri, R. A. (2003). Airway smooth muscle: Contraction and beyond. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 35(3), 272–276. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(02\)00259-5](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(02)00259-5)
- ATCC. (2014). *ATCC Animal Cell Culture Guide*. Online verfügbar unter: https://www.atcc.org/~media/PDFs/Culture%20Guides/AnimCellCulture_Guide.ashx; zuletzt geprüft am 05.12.2019
- Bai, J., & Xi, Q. (2018). Crosstalk between TGF- β signaling and epigenome. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 50(1), 60–67. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmx122>
- Bandaranayake, A. D., & Almo, S. C. (2014). Recent advances in mammalian protein production. *FEBS Letters*, 588(2), 253–260. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.11.035>
- Bara, I., Ozier, A., Tunon De Lara, J. M., Marthan, R., & Berger, P. (2010). Pathophysiology of bronchial smooth muscle remodelling in asthma. *European Respiratory Journal*, 36(5), 1174–1184. <https://doi.org/10.1183/09031936.00019810>
- Barberà, J. A., Román, A., Gómez-Sánchez, Miguel Ángel Blanco, I., Otero, R., López-Reyes, R., Otero, I., ... Escribano, P. (2017). *Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension: Summary of Recommendations & (xx)*. <https://doi.org/doi: 10.1016/j.arbres.2017.11.014>

- Barnes, P., & Adcock, J. (2009). Glucocorticoid Resistance in Inflammatory Diseases. *NeuroImmune Biology*, 373(9678), 1905–17. [https://doi.org/doi: 10.1016/S0140-6736\(09\)60326-3](https://doi.org/doi: 10.1016/S0140-6736(09)60326-3)
- Barnes, P., Bonini, S., Seeger, W., Belvisi, M., Ward, B., & Holmes, A. (2015). Barriers to new drug development in respiratory disease. *European Respiratory Journal*, 45(5), 1197–1207. <https://doi.org/DOI: 10.1183/09031936.00007915>
- Barnes, P. J. (2001). Histamine and serotonin. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, 14(5), 329–339. <https://doi.org/10.1006/pupt.2000.0318>
- Barnes, P. J. (2009). The cytokine network in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 41(6), 631–638. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0220TR>
- Barnes, P. J. (2010). New therapies for asthma: Is there any progress? *Trends in Pharmacological Sciences*, 31(7), 335–343. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2010.04.009>
- Beamish, J. A., He, P., Kottke-Marchant, K., & Marchant, R. E. (2010). Molecular Regulation of Contractile Smooth Muscle Cell Phenotype: Implications for Vascular Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 16(5), 467–491. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2009.0630>
- Berair, R., Hollins, F., & Brightling, C. (2013). Airway smooth muscle in asthma. *Journal of Allergy*. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1155/2013/185971>
- Bernard, O., Reid, H. H., & Bartlett, P. F. (1989). Role of the c-myc and the N-myc proto-oncogenes in the immortalization of neural precursors. *Journal of Neuroscience Research*, 24(1), 9–20. <https://doi.org/10.1002/jnr.490240104>
- Bhattacharya, R., Banerjee Mustafi, S., Street, M., Dey, A., & Dwivedi, S. K. D. (2015). Bmi-1: At the crossroads of physiological and pathological biology. *Genes and Diseases*, 2(3), 225–239. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2015.04.001>
- Bidan, C. M., Veldsink, A. C., Meurs, H., & Gosens, R. (2015). Airway and extracellular matrix mechanics in COPD. *Frontiers in Physiology*, 6(DEC). <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00346>
- Billington, C. K., & Penn, R. B. (2003). Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. *Respiratory Research*, 4, 1–23. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-4-2>
- BIO-RAD. (n.d.). *Real-Time PCR Applications Guide*. Retrieved from http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf ;zuletzt geprüft am 05.12.2019
- Blacher, S., Erpicum, C., Lenoir, B., Paupert, J., Moraes, G., Ormenese, S., ... Noel, A. (2014). Cell invasion in the spheroid sprouting assay: A spatial organisation analysis adaptable to cell behaviour. *PLoS ONE*, 9(5), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097019>
- Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C. P., Morin, G. B., ... Wright, W. E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, 279(5349), 349–352. <https://doi.org/10.1126/science.279.5349.349>
- Bono, N., Pezzoli, D., Levesque, L., Loy, C., Candiani, G., Fiore, G. B., & Mantovani, D. (2016). Unraveling the role of mechanical stimulation on smooth muscle cells: A comparative study between 2D and 3D models. *Biotechnology and Bioengineering*,

- 113(10), 2254–2263. <https://doi.org/10.1002/bit.25979>
- Bossé, Y., Rousseau, É., Amrani, Y., & Grunstein, M. M. (2013). Smooth Muscle Hypercontractility in Airway Hyperresponsiveness: Innate, Acquired, or Nonexistent? *Journal of Allergy*, 2013, 1–4. <https://doi.org/10.1155/2013/938046>
- Boyer, C. J., Ballard, D. H., Barzegar, M., Yun, J. W., Woerner, J. E., Ghali, G. E., ... Alexander, J. S. (2018). *High-throughput scaffold-free microtissues through 3D printing*. 0–5.
- Bratosin, D., Mitrofan, L., Palii, C., Estaquier, J., & Montreuil, J. (2005). Novel fluorescence assay using calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and aging. *Cytometry Part A*, 66(1), 78–84. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20152>
- Brewer, G. J., Torricelli, J. R., Evege, E. K., & Price, P. J. (1993). Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented neurobasal™, a new serum-free medium combination. *Journal of Neuroscience Research*, 35(5), 567–576. <https://doi.org/10.1002/jnr.490350513>
- Brown, I. A. M., Diederich, L., Good, M. E., DeLalio, L. J., Murphy, S. A., Cortese-Krott, M. M., ... Isakson, B. E. (2018). Vascular smooth muscle remodeling in conductive and resistance arteries in hypertension. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 38(9), 1969–1985. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.311229>
- Buels, K. S., & Fryer, A. D. (2012). Muscarinic receptor antagonists: Effects on pulmonary function. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 208(208), 317–341. https://doi.org/10.1007/978-3-642-23274-9_14
- Buhl, R. (2005). Anti-IgE antibodies for the treatment of asthma. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 11(1), 27–34. <https://doi.org/10.1097/01.mcp.0000147860.83639.30>
- Burgess, J. K., Ketheson, A., Faiz, A., Limbert Rempel, K. A., Oliver, B. G., Ward, J. P. T., & Halayko, A. J. (2018). Phenotype and Functional Features of Human Telomerase Reverse Transcriptase Immortalized Human Airway Smooth Muscle Cells from Asthmatic and Non-Asthmatic Donors. *Scientific Reports*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18429-0>
- Bush, A. (2019). Pathophysiological Mechanisms of Asthma. *Frontiers in Pediatrics*, 7(March), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00068>
- Chang, T. W., Wu, P. C., Hsu, C. L., & Hung, A. F. (2007). Anti-IgE Antibodies for the Treatment of IgE-Mediated Allergic Diseases. *Advances in Immunology*, 93(06), 63–119. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(06\)93002-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(06)93002-8)
- Chen, L., Ge, Q., Tjin, G., Alkhouri, H., Deng, L., Brandsma, C. A., ... Oliver, B. G. G. (2014). Effects of cigarette smoke extract on human airway smooth muscle cells in COPD. *European Respiratory Journal*, 44(3), 634–646. <https://doi.org/10.1183/09031936.00171313>
- Chen, P. Y., Qin, L., Li, G., Tellides, G., & Simons, M. (2016). Fibroblast growth factor (FGF) signaling regulates transforming growth factor beta (TGFβ)-dependent smooth muscle cell phenotype modulation. *Scientific Reports*, 6(August), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep33407>
- Chen, S., & Lechleider, R. J. (2004). Transforming growth factor-β-induced differentiation of smooth muscle from a neural crest stem cell line. *Circulation Research*, 94(9), 1195–

1202. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000126897.41658.81>
- Chen, Y., Stevens, B., Chang, J., Milbrandt, J., Barres, B., & Hell, J. (2008). NS21: Re-defined and Modified Supplement B27 for Neuronal Cultures. *J Neurosci Methods*, 171(2), 239–247. <https://doi.org/doi:10.1016/j.jneumeth.2008.03.013>
- Cho, J. H., Dimri, M., & Dimri, G. P. (2013). A positive feedback loop regulates the expression of polycomb group protein BMI1 via WNT signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 288(5), 3406–3418. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.422931>
- Cooper, G. (2000). *The Cell: A Molecular Approach* (2nd ed.; S. Associates, ed.).
- D'Aiuto, L., Zhi, Y., Kumar Das, D., Wilcox, M. R., Johnson, J. W., Mc Clain, L., ... Nimgaonka, V. L. (2014). Large-scale generation of human ipsc-derived neural stem cells/early neural progenitor cells and their neuronal differentiation. *Organogenesis*, 10(4), 365–377. <https://doi.org/10.1080/15476278.2015.1011921>
- Dale, P., Head, V., Dowling, M. R., & Taylor, C. W. (2018). Selective inhibition of histamine-evoked Ca²⁺ signals by compartmentalized cAMP in human bronchial airway smooth muscle cells. *Cell Calcium*, 71(December 2017), 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.12.002>
- Daniel, M., Peek, G., & Tollefsbol, T. (2012). *Regulation of the human catalytic subunit of telomerase (hTERT)*. 498(2), 135–146. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.01.095>
- Day, R. M., Agyeman, A. S., Segel, M. J., Chévere, R. D., Angelosanto, J. M., Suzuki, Y. J., & Fanburg, B. L. (2006). Serotonin induces pulmonary artery smooth muscle cell migration. *Biochemical Pharmacology*, 71(3), 386–397. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.10.035>
- Deugnier, M. A., Teulière, J., Faraldo, M. M., Thiery, J. P., & Glukhova, M. A. (2002). The importance of being a myoepithelial cell. *Breast Cancer Research*, 4(6), 224–230. <https://doi.org/10.1186/bcr459>
- Diebold, Y., Calonge, M., De Salamanca, A. E., Callejo, S., Corrales, R. M., Sáez, V., ... Stern, M. E. (2003). Characterization of a spontaneously immortalized cell line (IOBA-NHC) from normal human conjunctiva. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 44(10), 4263–4274. <https://doi.org/10.1167/iovs.03-0560>
- Dumont, J., Euwart, D., Mei, B., Estes, S., & Kshirsagar, R. (2016). Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(6), 1110–1122. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1084266>
- Duncan, E. M., & Fahy, J. V. (2017). Asthma and corticosteroids: time for a more precise approach to treatment. *The European Respiratory Journal*, 49(6), 12–14. <https://doi.org/10.1183/13993003.01167-2017>
- Durham, A. L., Speer, M. Y., Scatena, M., Giachelli, C. M., & Shanahan, C. M. (2018). Role of smooth muscle cells in vascular calcification: Implications in atherosclerosis and arterial stiffness. *Cardiovascular Research*, 114(4), 590–600. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy010>
- Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F., & Yang, L. (2014). Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and Drug Development Technologies*, 12(4), 207–218. <https://doi.org/10.1089/adt.2014.573>

- Ehlert, F., Gregory, S., & Evette, E. (1999). *CONTRACTILE ROLE OF M2 AND M3 MUSCARINIC RECEPTORS IN GASTROINTESTINAL SMOOTH MUSCLE*.
- Elliott, W. (2007). *Systemic Hypertension*. 32(4), 201-259, <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2007.01.002>
- Faghih, H., Javeri, A., Amini, H., & Taha, M. F. (2019). Directed differentiation of human adipose tissue-derived stem cells to dopaminergic neurons in low-serum and serum-free conditions. *Neuroscience Letters*, 708(April), 134353. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134353>
- Faksh, A., Britt, R. D., Vogel, E. R., Thompson, M. A., Pandya, H. C., Martin, R. J., ... Prakash, Y. S. (2015). TLR3 activation increases chemokine expression in human fetal airway smooth muscle cells. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 310(2), L202–L211. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00151.2015>
- Fitzsimons, R., Van Der Poel, L. A., Thornhill, W., Du Toit, G., Shah, N., & Brough, H. A. (2015). Antihistamine use in children. *Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition*, 100(3), 122–131. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304446>
- Frismantiene, A., Philippova, M., Erne, P., & Resink, T. J. (2018). Smooth muscle cell-driven vascular diseases and molecular mechanisms of VSMC plasticity. *Cellular Signalling*, 52(July), 48–64. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.08.019>
- Gan, W. Q., FitzGerald, J. M., Carlsten, C., Sadatsafavi, M., & Brauer, M. (2013). Associations of ambient air pollution with chronic obstructive pulmonary disease hospitalization and mortality. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 187(7), 721–727. <https://doi.org/10.1164/rccm.201211-2004OC>
- Gil, J., Kerai, P., Lleonart, M., Bernard, D., Cigudosa, J. C., Peters, G., ... Beach, D. (2005). Immortalization of primary human prostate epithelial cells by c-Myc. *Cancer Research*, 65(6), 2179–2185. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-4030>
- Girodet, P. O., Ozier, A., Bara, I., Tunon De Lara, J. M., Marthan, R., & Berger, P. (2011). Airway remodeling in asthma: New mechanisms and potential for pharmacological intervention. *Pharmacology and Therapeutics*, 130(3), 325–337. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.02.001>
- Goldsmith, A. M., Bentley, J. K., Zhou, L., Jia, Y., Bitar, K. N., Fingar, D. C., & Hershenson, M. B. (2006). Transforming growth factor- β induces airway smooth muscle hypertrophy. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 34(2), 247–254. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2005-0166OC>
- Gosens, R., Stelmack, G. L., Dueck, G., McNeill, K. D., Yamasaki, A., Gerthoffer, W. T., ... Halayko, A. J. (2006). Role of caveolin-1 in p42/p44 MAP kinase activation and proliferation of human airway smooth muscle. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 291(3). <https://doi.org/10.1152/ajplung.00013.2006>
- Guo, X. (2012). Transforming growth factor- β and smooth muscle differentiation. *World Journal of Biological Chemistry*, 3(3), 41. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v3.i3.41>
- Hafen, B. B., & Burns, B. (2018). *Anatomy , Smooth Muscle Blood Supply and Lymphatics*. 1–6. online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532857/>; zuletzt geprüft am 05.12.2019
- Hahn, W. C., Counter, C. M., Lundberg, A. S., Beijersbergen, R. L., Brooks, M. W., & Weinberg, R. A. (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements.

- Nature*, 400(6743), 464–468. <https://doi.org/10.1038/22780>
- Han, M., Wen, J.-K., Zheng, B., Cheng, Y., & Zhang, C. (2006). Serum deprivation results in redifferentiation of human umbilical vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 291(1), C50–C58. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00524.2005>
- Harnett, K. M., & Biancani, P. (2003). Calcium-dependent and calcium-independent contractions in smooth muscles. *American Journal of Medicine*, 115(3 SUPPL. 1), 24–30. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(03\)00232-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(03)00232-8)
- Hauser, A. S., Attwood, M. M., Rask-Andersen, M., Schiöth, H. B., & Gloriam, D. E. (2017). Trends in GPCR drug discovery: New agents, targets and indications. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(12), 829–842. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.178>
- Hayflick, L., & Moorhead, P. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strain. *Experimental Cell Research*, 25, 585–621.
- Hebert, T. L., Wu, X., Yu, G., Goh, B. C., Halvorsen, Y. D. C., Wang, Z., ... Gimble, J. M. (2009). Culture effects of epidermal growth factor (EGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) on cryopreserved human adipose-derived stromal/stem cell proliferation and adipogenesis. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 3(7), 553–561. <https://doi.org/10.1002/term.198>
- Hedström, U., Hallgren, O., Öberg, L., Demicco, A., Vaarala, O., Westergren-Thorsson, G., & Zhou, X. (2018). Bronchial extracellular matrix from COPD patients induces altered gene expression in repopulated primary human bronchial epithelial cells. *Scientific Reports*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21727-w>
- Heiss, M., Hellström, M., Kalén, M., May, T., Weber, H., Hecker, M., ... Korff, T. (2015). Endothelial cell spheroids as a versatile tool to study angiogenesis in vitro. *FASEB Journal*, 29(7), 3076–3084. <https://doi.org/10.1096/fj.14-267633>
- Hollins, F., Sutcliffe, A., Gomez, E., Berair, R., Russell, R., Szyndralewicz, C., ... Brightling, C. (2016). Airway smooth muscle NOX4 is upregulated and modulates ROS generation in COPD. *Respiratory Research*, 17(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/s12931-016-0403-y>
- Honda, E., Yoshida, K., & Munakata, H. (2010). Transforming growth factor- β upregulates the expression of integrin and related proteins in MRC-5 Human Myofibroblasts. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 220(4), 319–327. <https://doi.org/10.1620/tjem.220.319>
- Hong, H., & Stegemann, J. (2008). 2D and 3D collagen and fibrin biopolymers promote specific ECM and integrin gene expression by vascular smooth muscle cells. *J Biomater Sci Polym Ed.*, 19(10), 1279–1293. <https://doi.org/10.1163/156856208786052380>
- Huang, H., Li, Y., Liang, J., & Finkelman, F. D. (2018). Molecular regulation of histamine synthesis. *Frontiers in Immunology*, 9(JUN), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01392>
- Iser, I. C., de Campos, R. P., Bertoni, A. P. S., & Wink, M. R. (2015). Identification of valid endogenous control genes for determining gene expression in C6 glioma cell line treated with conditioned medium from adipose-derived stem cell. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 75, 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.08.035>
- Iyer, D., Gambardella, L., Bernard, W. G., Serrano, F., Mascetti, V. L., Pedersen, R. A., ... Talasila, A. (2016). Robust derivation of epicardium and its differentiated smooth muscle

- cell progeny from human pluripotent stem cells. *Development*, 143(5), 904–904. <https://doi.org/10.1242/dev.136143>
- Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., ... Lamperska, K. (2018). 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science*, 14(4), 910–919. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63743>
- Kennedy, E., Hakimjavadi, R., Greene, C., Mooney, C. J., Fitzpatrick, E., Collins, L. E., ... Cahill, P. A. (2014). Embryonic rat vascular smooth muscle cells revisited - A model for neonatal, neointimal SMC or differentiated vascular stem cells? *Vascular Cell*, 6(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/2045-824X-6-6>
- Khalil, R. (2010). *Regulation of Vascular Smooth Muscle Function* (M. & C. L. Sciences, ed.). online verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54586/>; zuletzt geprüft am 05.12.2019
- Kim, J. Do, Kim, H., Ekram, M. B., Yu, S., Faulk, C., & Kim, J. (2011). Rex1/Zfp42 as an epigenetic regulator for genomic imprinting. *Human Molecular Genetics*, 20(7), 1353–1362. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr017>
- Kim, H. J., Kim, Y., Park, S. J., Bae, B., Kang, H. R., Cho, S. H., ... Kim, S. J. (2015). Airway smooth muscle sensitivity to methacholine in precision-cut lung slices (PCLS) from ovalbumin-induced asthmatic mice. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, 19(1), 65–71. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2015.19.1.65>
- Kim, H. R., Appel, S., Vetterkind, S., Gangopadhyay, S. S., & Morgan, K. G. (2008). Smooth muscle signalling pathways in health and disease: Contractility in Health and Disease Review Series. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(6A), 2165–2180. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00552.x>
- Kips, J. C., & Pauwels, R. A. (2001). Pulmonary Perspective Long-acting Inhaled β_2 - Agonist Therapy in Asthma. *Critical Care Medicine*, 164, 923–932.
- Kiyono, T., Foster, S. A., Koop, J. I., McDougall, J. K., Galloway, D. A., & Klingelhutz, A. J. (1998). Both Rb/p16(INK4a) inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature*, 396(6706), 84–88. <https://doi.org/10.1038/23962>
- Knight, E., & Przyborski, S. (2015). Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. *Journal of Anatomy*, 227(6), 746–756. <https://doi.org/10.1111/joa.12257>
- Korff, T. (2004). Three-Dimensional in Vitro Angiogenesis Assays. *Methods in Endothelial Cell Biology*, 115–123. https://doi.org/10.1007/978-3-642-18725-4_12
- Kosentka, P., Sprague, S. L., Ryberg, M., Gartz, J., May, A. L., Campagna, S. R., & Matheny, P. B. (2013). Evolution of the Toxins Muscarine and Psilocybin in a Family of Mushroom-Forming Fungi. *PLoS ONE*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064646>
- Kullmann, F. A., Daugherty, S. L., de Groat, W. C., & Birder, L. A. (2014). Bladder smooth muscle strip contractility as a method to evaluate lower urinary tract pharmacology. *Journal of Visualized Experiments*, (90), 1–11. <https://doi.org/10.3791/51807>
- Kumar, A., D'Souza, S. S., Moskvina, O. V., Toh, H., Wang, B., Zhang, J., ... Slukvin, I. I. (2017). Specification and Diversification of Pericytes and Smooth Muscle Cells from

- Mesenchymoangioblasts. *Cell Reports*, 19(9), 1902–1916. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.019>
- Kuo, I. Y., & Ehrlich, B. E. (2015). Signaling in muscle contraction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(2), 1–14. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006023>
- Lam, M., Lamanna, E., & Bourke, J. E. (2019). *Smooth Muscle Spontaneous Activity* (Vol. 1124). <https://doi.org/10.1007/978-981-13-5895-1>
- Lathia, J. D., & Liu, H. (2017). Overview of Cancer Stem Cells and Stemness for Community Oncologists. *Targeted Oncology*, 12(4), 387–399. <https://doi.org/10.1007/s11523-017-0508-3>
- Lauzon, A. M., & Martin, J. G. (2016). Airway hyperresponsiveness; smooth muscle as the principal actor. *F1000Research*, 5(0), 1–9. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7422.1>
- Lin, C., Li, X., Luo, Q., Yang, H., Li, L., Zhou, Q., ... Wu, L. (2017). RELM- β promotes human pulmonary artery smooth muscle cell proliferation via FAK-stimulated surviving. *Experimental Cell Research*, 351(1), 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.12.021>
- Lindl, T., & Gstraunthaler, G. (2013). *Zell-und Gewebekultur*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-35997-2> Die
- Lippert, H., Herbold, D., & Lippert-Burmester, W. (2006). *Anatomie. Test und Atlas*; ISBN: 978-3437261817
- Lipps, C., Klein, F., Wahlicht, T., Seiffert, V., Butueva, M., Zauers, J., ... May, T. (2018). Expansion of functional personalized cells with specific transgene combinations. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03408-4>
- Liu, R., & Jin, J.-P. (2017). Calponin Isoforms CNN1, CNN2 and CNN3: Regulators for Actin Cytoskeleton Functions in Smooth Muscle and Non-Muscle Cells. *Gene*, 585(1), 143–153. <https://doi.org/doi:10.1016/j.gene.2016.02.040>
- Liu, S. (2018). *Single-Cell Ca²⁺ Imaging*. 1868, 69–77. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8802-0_17
- Liu, S. C., Chu, Y. H., Kao, C. H., Wu, C. C., & Wang, H. W. (2015). Steroids and antihistamines synergize to inhibit rat's airway smooth muscle contractility. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 272(6), 1443–1449. <https://doi.org/10.1007/s00405-014-3240-y>
- Liu, X., Disbrow, G. L., Yuan, H., Tomaic, V., & Schlegel, R. (2007). Myc and Human Papillomavirus Type 16 E7 Genes Cooperate To immortalize Human Keratinocytes. *Journal of Virology*, 81(22), 12689–12695. <https://doi.org/10.1128/jvi.00669-07>
- Liu, Yun, Sun, X., Wu, Y., Fang, P., Shi, H., Xu, J., & Li, M. (2015). Effects of miRNA-145 on airway smooth muscle cells function. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 409(1–2), 135–143. <https://doi.org/10.1007/s11010-015-2519-7>
- Liu, Yunxiao, Rayatpisheh, S., Chew, S. Y., & Chan-Park, M. B. (2012). Impact of endothelial cells on 3D cultured smooth muscle cells in a biomimetic hydrogel. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 4(3), 1378–1387. <https://doi.org/10.1021/am201648f>
- Low, E. L., Baker, A. H., & Bradshaw, A. C. (2019). TGF β smooth muscle cells and coronary artery disease: a review. *Cellular Signalling*, 53(May 2018), 90–101. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.09.004>

- Ma, X., Wang, Y., & Newman, S. (1998). Serum deprivation induces a unique hypercontractile phenotype of cultured smooth muscle cells. *American Journal of Physiology*, 274(5 PART1). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1998.274.5.C1206>
- MacLean, M. (Mandy) R. (2018). The serotonin hypothesis in pulmonary hypertension revisited: targets for novel therapies (2017 Grover Conference Series). *Pulmonary Circulation*, 8(2). <https://doi.org/10.1177/2045894018759125>
- Månsson Kvarnhammar, A., Tengroth, L., Adner, M., & Cardell, L. O. (2013). Innate Immune Receptors in Human Airway Smooth Muscle Cells: Activation by TLR1/2, TLR3, TLR4, TLR7 and NOD1 Agonists. *PLoS ONE*, 8(7), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068701>
- Marcos, E., Fadel, E., Sanchez, O., Humbert, M., Darteville, P., Simonneau, G., ... Eddahibi, S. (2004). Serotonin-induced smooth muscle hyperplasia in various forms of human pulmonary hypertension. *Circulation Research*, 94(9), 1263–1270. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000126847.27660.69>
- Mastalerz, L., & Kumik, J. (2010). Antileukotriene drugs in the treatment of asthma. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*, 120(3), 103–108. <https://doi.org/10.20452/pamw.899>
- Mauban, J., Wilkinson, K., Schach, C., & Yuan, J. (2007). Histamine-mediated Increases in Cytosolic [Ca²⁺] Involve Different Mechanisms in Human Pulmonary Artery Smooth Muscle and Endothelial Cells. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 290(2), C325–C336.
- May, T., Hauser, H., & Wirth, D. (2012). Zellsysteme: Funktionale zelllinien durch neue immortalisierungsprotokolle. *BioSpektrum*, 18(4), 390–393. <https://doi.org/10.1007/s12268-012-0199-3>
- Metz, R. P., Patterson, J. L., & Wilson, E. (2012). Cardiovascular Development. *Cardiovascular Development: Methods and Protocols*, 843, 169–176. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-523-7>
- Michaeloudes, C., Kuo, C. H., Haji, G., Finch, D. K., Halayko, A. J., Kirkham, P., ... Adcock, I. M. (2017). Metabolic re-patterning in COPD airway smooth muscle cells. *The European Respiratory Journal*, 50(5). <https://doi.org/10.1183/13993003.00202-2017>
- Michaeloudes, C., Sukkar, M. B., Khorasani, N. M., Bhavsar, P. K., & Chung, K. F. (2011). TGF- β regulates Nox4, MnSOD and catalase expression, and IL-6 release in airway smooth muscle cells. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 300(2), 295–304. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00134.2010>
- Mikawa, T., & Gourdie, R. G. (1996). Pericardial mesoderm generates a population of coronary smooth muscle cells migrating into the heart along with ingrowth of the epicardial organ. *Developmental Biology*, 174(2), 221–232. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0068>
- Mims, J. W. (2015). Asthma: Definitions and pathophysiology. *International Forum of Allergy and Rhinology*, 5(April), S2–S6. <https://doi.org/10.1002/alr.21609>
- Mistriotis, P., Bajpai, V., Wang, X., Rong, N., Shahini, A., Asmani, M., ... Andreadis, S. T. (2016). NANOG Reverses the Myogenic Differentiation Potential of Senescent Stem Cells by Restoring ACTIN Filamentous Organization and. 207–221. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1002/stem.2452>
- Morgan, A. J., & Jacob, R. (1994). Ionomycin enhances Ca²⁺ influx by stimulating store-

- regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane. *Biochemical Journal*, 300(3), 665–672. <https://doi.org/10.1042/bj3000665>
- Mukund, K., & Subramaniam, S. (2019). Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, (April), 1–46. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1462>
- Nakamura, S., Nakanishi, A., Takazawa, M., Okihiro, S., Urano, S., & Fukui, K. (2016). Ionomycin-induced calcium influx induces neurite degeneration in mouse neuroblastoma cells: analysis of a time-lapse live cell imaging system. *Free Radical Research*, 50(11), 1214–1225. <https://doi.org/10.1080/10715762.2016.1227074>
- Neuhaus, V., Danov, O., Konzok, S., Obernolte, H., Dehmel, S., Braubach, P., ... Sewald, K. (2018). Assessment of the cytotoxic and immunomodulatory effects of substances in human precision-cut lung slices. *Journal of Visualized Experiments*, 2018(135), 1–14. <https://doi.org/10.3791/57042>
- Nguyen, Q., Dominguez, J., Nguyen, L., & Gullapalli, N. (2010). Hypertension management: An update. *American Health and Drug Benefits*, 3(1), 47–55.
- Ning, H., Lin, G., Lue, T. F., & Lin, C. S. (2013). A coculture system of cavernous endothelial and smooth muscle cells. *International Journal of Impotence Research*, 25(2), 63–68. <https://doi.org/10.1038/ijir.2012.36>
- Ojiaku, C. A., Cao, G., Zhu, W., Yoo, E. J., Shumyatcher, M., Himes, B. E., ... Panettieri, R. A. (2018). TGF- β 1 evokes human airway smooth muscle cell shortening and hyperresponsiveness via Smad3. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 58(5), 575–584. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0247OC>
- Ozaki, T., & Nakagawara, A. (2011). Role of p53 in cell death and human cancers. *Cancers*, 3(1), 994–1013. <https://doi.org/10.3390/cancers3010994>
- Pan, Y., Liu, L., Li, S., Wang, K., Ke, R., Shi, W., ... Li, M. (2018). Activation of AMPK inhibits TGF- β 1-induced airway smooth muscle cells proliferation and its potential mechanisms. *Scientific Reports*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21812-0>
- Pantazaka, E., Taylor, E. J. A., Bernard, W. G., & Taylor, C. W. (2013). Ca²⁺ signals evoked by histamine H1 receptors are attenuated by activation of prostaglandin EP2 and EP4 receptors in human aortic smooth muscle cells. *British Journal of Pharmacology*, 169(7), 1624–1634. <https://doi.org/10.1111/bph.12239>
- Paulin, D., & Li, Z. (2004). Desmin: A major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Experimental Cell Research*, 301(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.08.004>
- Peehl, D. M., & Sellers, R. G. (1998). Basic FGF, EGF, and PDGF modify TGF β -induction of smooth muscle cell phenotype in human prostatic stromal cells. *Prostate*, 35(2), 125–134. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0045\(19980501\)35:2<125::AID-PROS6>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0045(19980501)35:2<125::AID-PROS6>3.0.CO;2-I)
- Perbellini, F., Watson, S. A., Bardi, I., & Terracciano, C. M. (2018). Heterocellularity and Cellular Cross-Talk in the Cardiovascular System. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 5(November), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00143>
- Pérez-Campo, F. M., May, T., Zauers, J., Sañudo, C., Delgado-Calle, J., Arozamena, J., ... Riancho, J. A. (2017). Generation and characterization of two immortalized human osteoblastic cell lines useful for epigenetic studies. *Journal of Bone and Mineral*

- Metabolism*, 35(2), 150–160. <https://doi.org/10.1007/s00774-016-0753-z>
- Perez-Reyes, N., Halbert, C. L., Smith, P. P., Benditt, E. P., & McDougall, J. K. (1992). Immortalization of primary human smooth muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(4), 1224–1228. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.4.1224>
- Perrin, B. J., & Ervasti, J. M. (2010). The actin gene family: Function follows isoform. *Cytoskeleton*, 67(10), 630–634. <https://doi.org/10.1002/cm.20475>
- Pfisterer, L., & Korff, T. (2016). *Spheroid-Based In Vitro Angiogenesis Model*. 1430, 283–298. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3628-1>
- Piechaczyk, M., & Blanchard, J.-M. (1994). c-fos proto-oncogene regulation and function. *Critical Reviews in ONCOLOGY/HEMATOLOGY*, 17, 93–131.
- Pollard, T., & Earnshaw, W. (2007). *Cell Biology*. Das Original mit Übersetzungshilfen. 2. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl. (Easy reading). ISBN: 978-3827418616
- Rao, R. S., Miano, J. M., Olson, E. N., & Seidel, C. L. (1997). The A10 cell line: A model for neonatal, neointimal, or differentiated vascular smooth muscle cells? *Cardiovascular Research*, 36(1), 118–126. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(97\)00156-9](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(97)00156-9)
- Rask-Andersen, M., Masuram, S., & Schiöth, H. B. (2014). The Druggable Genome: Evaluation of Drug Targets in Clinical Trials Suggests Major Shifts in Molecular Class and Indication. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 54(1), 9–26. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011613-135943>
- Rensen, S. S. M., Doevendans, P. A. F. M., & Van Eys, G. J. J. M. (2007). Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Netherlands Heart Journal*, 15(3), 100–108. <https://doi.org/10.1007/BF03085963>
- Restrepo, R. D. (2007). Use of inhaled anticholinergic agents in obstructive airway disease. *Respiratory Care*, 52(7), 833–851.
- Rohr, S. (2004). Role of gap junctions in the propagation of the cardiac action potential. *Cardiovascular Research*, 62(2), 309–322. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2003.11.035>
- Roostalu, U., & Wong, J. K. (2018). Arterial smooth muscle dynamics in development and repair. *Developmental Biology*, 435(2), 109–121. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.01.018>
- Roschger, C., & Cabrele, C. (2017). The Id-protein family in developmental and cancer-associated pathways Fritz Aberger. *Cell Communication and Signaling*, 15(1), 1–26. <https://doi.org/10.1186/s12964-016-0161-y>
- Ryan, J. J., Thenappan, T., Luo, N., Ha, T., Patel, A. R., Rich, S., & Archer, S. L. (2012). The who classification of pulmonary hypertension: A case-based imaging compendium. *Pulmonary Circulation*, 2(1), 107–121. <https://doi.org/10.4103/2045-8932.94843>
- Sakota, Y., Ozawa, Y., Yamashita, H., Tanaka, H., & Inagaki, N. (2014). Collagen gel contraction assay using human bronchial smooth muscle cells and its application for evaluation of inhibitory effect of formoterol. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 37(6), 1014–1020. <https://doi.org/10.1248/bpb.b13-00996>
- Sanders, K. M. (2008). Regulation of smooth muscle excitation and contraction. *Neurogastroenterology and Motility*, 20(SUPPL. 1), 39–53.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2008.01108.x>

- Sanderson, M. J. (2011). Exploring lung physiology in health and disease with lung slices. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, 24(5), 452–465. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2011.05.001>
- Sanyour, H., Childs, J., Meininger, G. A., & Hong, Z. (2018). Spontaneous oscillation in cell adhesion and stiffness measured using atomic force microscopy. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21253-9>
- Sapich, S., Hittinger, M., Hendrix-Jastrzebski, R., Repnik, U., Griffiths, G., May, T., ... Lehr, C. M. (2018). Murine alveolar epithelial cells and their lentivirus-mediated immortalisation. *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*, 46(2), 73–89. <https://doi.org/10.1177/026119291804600207>
- Schmitz, S. (2011). *Der Experimentator: Zellkultur*. 3. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag ; ISBN: 978-3-8274-2572-0
- Schreier, B., Gekle, M., & Grossmann, C. (2014). Role of epidermal growth factor receptor in vascular structure and function. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 23(2), 113–121. <https://doi.org/10.1097/01.mnh.0000441152.62943.29>
- Scirocco, A., Matarrese, P., Carabotti, M., Ascione, B., Malorni, W., & Severi, C. (2016a). Cellular and Molecular Mechanisms of Phenotypic Switch in Gastrointestinal Smooth Muscle. *Journal of Cellular Physiology*, 231(2), 295–302. <https://doi.org/10.1002/jcp.25105>
- Scott, R., Ramaswamy, A., Park, K., & Panitch, A. (2017). Decorin Mimic Promotes Endothelial Cell Health in Endothelial Monolayers and Endothelial-Smooth Muscle Co-Cultures. *Physiology & Behavior*, 11(5), 1365–1376. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Selvakumar, T. A., Bhushal, S., Kalinke, U., Wirth, D., Hauser, H., Köster, M., & Hornef, M. W. (2017). Identification of a predominantly interferon-λ-induced transcriptional profile in murine intestinal epithelial cells. *Frontiers in Immunology*, 8(OCT). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01302>
- Sengbusch, P. von. (1979). *Mikrofilamente; Aktin und Myosin*. https://doi.org/10.1007/978-3-642-67358-0_32
- Severi, C., Sferra, R., Scirocco, A., Vetusch, A., Pallotta, N., Pronio, A., ... Onori, P. (2014). Contribution of intestinal smooth muscle to Crohn's disease fibrogenesis. *European Journal of Histochemistry*, 58(4), 307–314. <https://doi.org/10.4081/ejh.2014.2457>
- Shahini, A., Mistriotis, P., Asmani, M., Zhao, R., & Andreadis, S. T. (2017). NANOG Restores Contractility of Mesenchymal Stem Cell-Based Senescent Microtissues. *Tissue Engineering - Part A*, 23(11–12), 535–545. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2016.0494>
- Shaikh, N., Johnson, M., Ahall, D., Chung, K. F., Hriley, J., Worsley, S., & Bhavsar, P. K. (2017). Intracellular interactions of umeclidinium and vilanterol in human airway smooth muscle. *International Journal of COPD*, 12, 1903–1913. <https://doi.org/10.2147/COPD.S134420>
- Shariff, S., Shelfoon, C., Holden, N. S., Traves, S. L., Wiehler, S., Kooi, C., ... Leigh, R. (2017). Human rhinovirus infection of epithelial cells modulates airway smooth muscle migration. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 56(6), 796–803. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2016-0252OC>

- Shen, H., Wang, M., Li, D., Yuan, S. T., & Liu, Q. H. (2019). A novel xeno-free culture system for human retinal pigment epithelium cells. *International Journal of Ophthalmology*, 12(4), 563–570. <https://doi.org/10.18240/ijo.2019.04.06>
- Sherr, C. J., & DePinho, R. A. (2000). Cellular senescence: Mitotic clock or culture shock? *Cell*, 102(4), 407–410. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00046-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00046-5)
- Simon, D. (2018). Recent advances in clinical allergy and immunology. *International Archives of Allergy and Immunology*, 177(4), 324–333. <https://doi.org/10.1159/000494931>
- Smeets, S. J., Van Der Plas, M., Schaaij-Visser, T. B. M., Van Veen, E. A. M., Van Meerloo, J., Braakhuis, B. J. M., ... Brakenhoff, R. H. (2011). Immortalization of oral keratinocytes by functional inactivation of the p53 and pRb pathways. *International Journal of Cancer*, 128(7), 1596–1605. <https://doi.org/10.1002/ijc.25474>
- Snidvongs, K., Seresirikachorn, K., Khattiyawittayakun, L., & Chitsuthipakorn, W. (2017). Sedative Effects of Levocetirizine: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Studies. *Drugs*, 77(2), 175–186. <https://doi.org/10.1007/s40265-016-0682-0>
- Solway, J., Seltzer, J., Samaha, F. F., Kim, S., Alger, L. E., Niu, Q., ... Parmacek, M. S. (1995). Structure and expression of a smooth muscle cell-specific gene, SM22 α . *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 270, pp. 13460–13469. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.22.13460>
- Später, D., Hansson, E. M., Zangi, L., & Chien, K. R. (2014). How to make a cardiomyocyte. *Development (Cambridge)*, 141(23), 4418–4431. <https://doi.org/10.1242/dev.091538>
- Stamatiou, R., Paraskeva, E., Vasilaki, A., Mylonis, I., Molyvdas, P. A., Gourgoulisanis, K., & Hatziefthimiou, A. (2014). Long-term exposure to muscarinic agonists decreases expression of contractile proteins and responsiveness of rabbit tracheal smooth muscle cells. *BMC Pulmonary Medicine*, 14(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2466-14-39>
- Sun, L. Q., Cairns, M. J., Gerlach, W. L., Witherington, C., Wang, L., & King, A. (1999). Suppression of smooth muscle cell proliferation by a c-myc RNA-cleaving deoxyribozyme. *Journal of Biological Chemistry*, 274(24), 17236–17241. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.24.17236>
- Suzuki, T., Higgins, P. J., & Crawford, D. R. (2000). Control selection for RNA quantitation. *BioTechniques*, 29(2), 332–337. <https://doi.org/10.2144/00292rv02>
- Sweeney, H. L., & Hammers, D. W. (2018). Muscle contraction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(2), 1–14. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023200>
- Tang, D. (2008). Intermediate filaments in smooth muscle. *Journal of Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00154.2007>
- Taylor, M. (2014). *Viruses and Man: A History of interactions*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-07758-1>
- Thangam, E. B., Jemima, E. A., Singh, H., Baig, M. S., Khan, M., Mathias, C. B., ... Saluja, R. (2018). The role of histamine and histamine receptors in mast cell-mediated allergy and inflammation: The hunt for new therapeutic targets. *Frontiers in Immunology*, 9(AUG), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01873>
- Tijore, A., Behr, J. M., Irvine, S. A., Baisane, V., & Venkatraman, S. (2018). Bioprinted gelatin hydrogel platform promotes smooth muscle cell contractile phenotype maintenance.

- Biomedical Microdevices*, 20(2). <https://doi.org/10.1007/s10544-018-0274-8>
- TODARO, G. J., & GREEN, H. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *The Journal of Cell Biology*, 17(6), 299–313. <https://doi.org/10.1083/jcb.17.2.299>
- Touyz, R. M., Alves-Lopes, R., Rios, F. J., Camargo, L. L., Anagnostopoulou, A., Arner, A., & Montezano, A. C. (2018). Vascular smooth muscle contraction in hypertension. *Cardiovascular Research*, 114(4), 529–539. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy023>
- Tsukatani, T., Suenaga, H., Higuchi, T., Akao, T., Ishiyama, M., Ezoe, K., & Matsumoto, K. (2008). Colorimetric cell proliferation assay for microorganisms in microtiter plate using water-soluble tetrazolium salts. *Journal of Microbiological Methods*, 75(1), 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.05.016>
- Tuz Zahra, F., Choleva, E., Sanaullah Sajib, M., Papadimitriou, E., & M. Mikelis, C. (2019). In vitro spheroid sprouting assay of angiogenesis. *Methods in Molecular Biology*, 1952, 211–218. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9133-4_17
- Uchida, C. (2016). Roles of pRB in the Regulation of Nucleosome and Chromatin Structures. *BioMed Research International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/5959721>
- Ullmer, C., Schmuck, K., Kalkman, H. O., & Lübbert, H. (1995). Expression of serotonin receptor mRNAs in blood vessels. *FEBS Letters*, 370(3), 215–221. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00828-W](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00828-W)
- Wang, C. C. L., Gurevich, I., & Draznin, B. (2003). Insulin Affects Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype and Migration Via Distinct Signaling Pathways. *October*, 52(October).
- Wang, Y., Chen, S., Yan, Z., & Pei, M. (2019). A prospect of cell immortalization combined with matrix microenvironmental optimization strategy for tissue engineering and regeneration 06 Biological Sciences 0601 Biochemistry and Cell Biology. *Cell and Bioscience*, 9(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13578-018-0264-9>
- Wasteson, P., Johansson, B. R., Jukkola, T., Breuer, S., Akydsurek, L. M., Partanen, J., & Lindahl, P. (2008). Developmental origin of smooth muscle cells in the descending aorta in mice. *Development*, 135(10), 1823–1832. <https://doi.org/10.1242/dev.020958>
- Webb, R. C. (2003). Smooth muscle contraction and relaxation. *American Journal of Physiology - Advances in Physiology Education*, 27(1–4), 201–206. <https://doi.org/10.1152/advan.00025.2003>
- Wei, C., Li, H. Z., Wang, Y. H., Peng, X., Shao, H. J., Li, H. X., ... Xu, C. Q. (2016). Exogenous spermine inhibits the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells caused by chemically-induced hypoxia via the suppression of the ERK1/2- and PI3K/AKT-associated pathways. *International Journal of Molecular Medicine*, 37(1), 39–46. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2408>
- Weinberger, F., Mannhardt, I., & Eschenhagen, T. (2017). Engineering Cardiac Muscle Tissue: A Maturing Field of Research. *Circulation Research*, 120(9), 1487–1500. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310738>
- World Health Organization. (2018). *Global Asthma Network The Global Asthma Report*. online verfügbar unter: <http://www.globalasthmareport.org/Global%20Asthma%20Report%202018.pdf>; zuletzt geprüft 05.12.2019

- Wright, D. B., Tripathi, S., Sikarwar, A., Santosh, K. T., Perez-Zoghbi, J., Ojo, O. O., ... Schaafsma, D. (2013). Regulation of GPCR-mediated smooth muscle contraction: Implications for asthma and pulmonary hypertension. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, 26(1), 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2012.06.005>
- Wright, D., Sharma, P., Ryu, M. H., Rissé, P. A., Ngo, M., Maarsingh, H., ... West, A. R. (2013). Models to study airway smooth muscle contraction in vivo, ex vivo and in vitro: Implications in understanding asthma. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, 26(1), 121–131. <https://doi.org/DOI: 10.1016/j.pupt.2012.06.005>
- Wylam, M. E., Sathish, V., VanOosten, S. K., Freeman, M., Burkholder, D., Thompson, M. A., ... Prakash, Y. S. (2015). Mechanisms of cigarette smoke effects on human airway smooth muscle. *PLoS ONE*, 10(6), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128778>
- Xia, Y., Fu, Z., Hu, J., Huang, C., Paudel, O., Chai, S., ... Sham, J. (2013). TRPV4 channel contributes to serotonin-induced pulmonary vasoconstriction and the enhanced vascular reactivity in chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 305(7), C704–C715. <https://doi.org/doi: 10.1152/ajpcell.00099.2013>
- Yabut, J. M., Crane, J. D., Green, A. E., Keating, D. J., Khan, W. I., & Steinberg, G. R. (2019). Emerging Roles for Serotonin in Regulating Metabolism: New Implications for an Ancient Molecule. *Endocrine Reviews*, 40(4), 1092–1107. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00283>
- Yamauchi, K., & Ogasawara, M. (2019). The role of histamine in the pathophysiology of asthma and the clinical efficacy of antihistamines in asthma therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7). <https://doi.org/10.3390/ijms20071733>
- Yan, F., Gao, H., Zhao, H., Bhatia, M., & Zeng, Y. (2018a). Roles of airway smooth muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Translational Medicine*, 16(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1635-z>
- Yang, H., Zhang, L., Weakley, S. M., Lin, P. H., Yao, Q., & Chen, C. (2011). Transforming growth factor- β increases the expression of vascular smooth muscle cell markers in human multi-lineage progenitor cells. *Medical Science Monitor*, 17(3), 1. <https://doi.org/10.12659/msm.881439>
- Yang, L., Geng, Z., Nickel, T., Johnson, C., Gao, L., Dutton, J., ... Zhang, J. (2016). Differentiation of human induced-pluripotent stem cells into smooth-muscle cells: Two novel protocols. *PLoS ONE*, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147155>
- Yang, Y., An, S., Liu, Y., Guo, X. X., Gao, L., Wei, J. F., & Xu, T. R. (2016). Novel serotonin receptor 2 (5-HT 2R) agonists and antagonists: A patent review (2004-2014). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 26(1), 89–106. <https://doi.org/10.1517/13543776.2016.1113257>
- Yuan, S. M. (2015). α -Smooth muscle actin and ACTA2 gene expressions in vasculopathies. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery*, 30(6), 644–649. <https://doi.org/10.5935/1678-9741.20150081>
- Zhang, H. J., Wang, J., Liu, H. F., Zhang, X. N., Zhan, M., & Chen, F. L. (2015). Overexpression of mimecan in human aortic smooth muscle cells inhibits cell proliferation and enhances apoptosis and migration. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 10(1), 187–192. <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2444>
- Zhang, Yuejin, Wei, F., Poh, Y., Jia, Q., Chen, J., Luo, J., ... Wang, N. (2018). *Interfacing 3D magnetic twisting cytometry with confocal fluorescence microscopy to image force*

- responses in living cells. 12(7), 1437–1450.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2017.042>. Interfacing
- Zhang, Yun, Alexander, P., & Wang, X.-F. (2017). TGF- β Family Signaling in the Control of Cell Proliferation and Survival. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1–22.
<https://doi.org/doi:10.1101/cshperspect.a022145>
- Zholos, A. V., Bolton, T. B., Dresvyannikov, A. V., Kustov, M. V., Tsvilovskii, V. V., & Shuba, M. F. (2004). Cholinergic excitation of smooth muscles: Multiple signaling pathways linking M2 and M3 muscarinic receptors to cationic channels. *Neurophysiology*, 36(5–6), 398–406. <https://doi.org/10.1007/s11062-005-0034-2>
- Zhou, L., Li, J., Goldsmith, A. M., Newcomb, D. C., Giannola, D. M., Vosk, R. G., ... Hershenson, M. B. (2004). Human Bronchial Smooth Muscle Cell Lines Show a Hypertrophic Phenotype Typical of Severe Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 169(6), 703–711. <https://doi.org/10.1164/rccm.200307-964oc>
- Zhou, Y., Kang, G., Wen, Y., Briggs, M., Sebastiano, V., Pederson, R., & Chen, B. (2018). Do Induced Pluripotent Stem Cell Characteristics Correlate with Efficient in Vitro Smooth Muscle Cell Differentiation? A Comparison of Three Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cell Lines. *Stem Cells and Development*, 27(20), 1438–1448.
<https://doi.org/10.1089/scd.2018.0031>
- Zhu, Y., He, L., & Zhou, Y. (2018). Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Stiffness and Adhesion by $[Ca^{2+}]_i$: an Atomic Force Microscopy-Based Study. *Microsc Microanal.*, 24(6), 708–712. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>